

# **Expression des Integrins $\alpha_E\beta_7$ auf CD4-positiven T-Lymphozyten**

*In-vitro*-Expansion von  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten,  
Charakterisierung von Stimulationsbedingungen, Phänotyp und  
Funktion

**DISSERTATION**

zur

Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Petra Gardina

geboren am 27.05.1973 in Bad Soden am Taunus

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Claus Kroegel  
Zweiter Gutachter: PD Dr. med. Udo Markert  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Hubert Wirtz, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03. Januar 2006

---

---

# 1 Abkürzungen

APC	Antigen-präsentierende Zelle
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation (Nomenklatur zellulärer Oberflächenantigene)
cDNA	komplementäre DNA
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
d’NTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
d’UTP	Desoxyuridintriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FCS	Fetal Calf Serum
h	Stunden
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
LK	Lymphknoten
MadCAM-1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
MHC	Major histocompatibility complex
n	Anzahl der Beobachtungen
NK	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphatebuffer saline

---

---

PCR	Polymerase chain reaction
MPCR	Multiplex-PCR
R	Rezeptor
RT	Reverse Transkriptase
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1

Weniger häufige Abkürzungen werden an der jeweiligen Textstelle erläutert.

## 2 Inhaltsverzeichnis

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>8</b>
<b>2 EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Interstitielle Lungenfibrosen</b>	<b>10</b>
2.1.1 Pathologische Klassifikation der IPF	10
2.1.2 Pathobiologie der IPF	11
<b>2.2 Intraepitheliale Lymphozyten</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Integrine</b>	<b>14</b>
2.3.1. Das Integrin $\alpha_E\beta_7$	16
2.3.2. $\alpha_E\beta_7$ -exprimierende T-Lymphozyten	17
<b>2.4. Die Rolle <math>E_7^+/CD4^+</math>-T-Lymphozyten im Rahmen pulmonaler Fibrosen</b>	<b>18</b>
<b>3 ZIELSETZUNG.....</b>	<b>19</b>
<b>4 MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Materialien</b>	<b>20</b>
4.1.1 Geräte	20
4.1.2 Chemikalien	20
4.1.3 Antikörper	21
4.1.4 Zytokine	22
4.1.5 Primer	22
4.1.6 Puffer	22
<b>4.2 Methoden</b>	<b>24</b>
4.2.1 Separation von $CD4^+$ -T-Lymphozyten	24
4.2.1.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut	24
4.2.1.2 Magnetische Zellseparation	25
4.2.2 Separation von $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten	26
4.2.3 Zellkultur	27

4.2.4 Durchflußzytometrie	28
4.2.5 Nachweis von mRNA-Expression	29
4.2.5.1 Isolierung von Total-RNA	29
4.2.5.2 Reverse Transkription	30
4.2.5.3 Polymerase-Ketten-Reaktion	30
4.2.5.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten	33
4.2.6 Statistik	34
<b>5 RESULTATE.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Kinetik der <math>\epsilon</math> <math>\gamma</math>-Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Einfluß von der Selektionsmethode auf die <math>\epsilon</math> <math>\gamma</math>-Expression</b>	<b>37</b>
<b>5.3 <math>\epsilon</math> <math>\gamma</math>-Expression in Abhängigkeit von sequentieller Aktivierung</b>	<b>39</b>
<b>5.4 <math>\epsilon</math> <math>\gamma</math>-Expression unter Einfluß zusätzlicher Stimuli</b>	<b>41</b>
<b>5.5 Expression anderer Oberflächenmoleküle im Vergleich zu <math>\epsilon</math> <math>\gamma</math></b>	<b>44</b>
5.5.1 CD25 (IL-2-R)	44
5.5.2 TNF-p75 (CD120b)	49
5.5.3 CD95 (Fas)	54
5.5.4 CD69	61
<b>5.6 Zytokin-Genexpression in CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten</b>	<b>65</b>
5.6.1 $\alpha_E\beta_7$ -mRNA-Expression in CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten	65
5.6.2 Unterschiede in der mRNA-Expression in CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten in Abhängigkeit von Stimulation und Selektionsmethode	67
5.6.3 Unterschiedliche mRNA-Expression in $\alpha_E\beta_7^{+/-}$ und $\alpha_E\beta_7^{-}$ /CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten	70
<b>6 DISKUSSION.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1 Bronchiale <math>\epsilon</math> <math>\gamma^{+}</math>-T-Lymphozyten bei Lungenfibrosen</b>	<b>72</b>
<b>6.2 In-vitro-Induktion von <math>\epsilon</math> <math>\gamma</math> auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten</b>	<b>75</b>
6.2.1 TGF- $\beta_1$ - profibrotisches Zytokin mit zentraler Bedeutung	75
6.2.2 Signalverstärkung durch Beteiligung des T-Zell-Rezeptors (TZR)	77
6.2.3 Die Bedeutung co-stimulatorischer Signale für CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten	79
6.2.4 Die $\alpha_E\beta_7$ -mRNA-Expression von CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten	81
<b>6.3 Phänotypische Charakterisierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>82</b>

---

---

<b>6.4 Funktionelle Charakterisierung von unterschiedlich isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Subpopulationen</b>	<b>85</b>
6.4.1 Die Genexpression von CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten	85
6.4.2 Unterschiede der Genexpression in $\alpha_E\beta_7^-$ und $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten	88
<b>7 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>89</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>91</b>
<b>9 DANKSAGUNG.....</b>	<b>109</b>
<b>10 LEBENSLAUF.....</b>	<b>110</b>
<b>11 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>110</b>

# 1 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand das Integrin  $\alpha_E\beta_7$ , das über die Bindung an E-Cadherin an der basolateralen Seite der Epithelzellen die Akkumulation der Lymphozyten im Epithel vermittelt. Klinische Studien zeigten eine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) und der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten. In der BAL von Fibrosepatienten waren bis zu 70% der  $CD4^+$ -T-Lymphozyten  $\alpha_E\beta_7$ -positiv, während die Zellen von gesunden Probanden das  $\alpha_E\beta_7$ -Antigen kaum an ihrer Oberfläche zeigten. Außerdem unterschieden sich  $CD4^+$ -T-Lymphozyten aus der BAL und aus dem Blut deutlich in ihrer  $\alpha_E\beta_7$ -Expression. Bei Patienten mit einer Lungenfibrose und einem hohen Anteil  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten in deren BAL waren die Blutlymphozyten überwiegend  $\alpha_E\beta_7$ -negativ. Diese Beobachtung der Expansion von  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten im Rahmen fibrotischer Lungenerkrankungen legt nahe, daß die Expression von  $\alpha_E\beta_7$  mit der fibrotischen Entzündung im Zusammenhang steht.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Stimulationsbedingungen, die eine  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten *in vitro* induzieren, sowie die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten. Hierfür wurden  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten aus dem Vollblut gesunder Probanden mittels Dichtezentrifugation und anschließender immunomagnetischer Separation gewonnen. Nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli erfolgte die durchflußzytometrische Messung der Oberflächenexpression von  $\alpha_E\beta_7$ . Der Einfluß unterschiedlicher Stimulationsbedingungen auf die Genexpression von  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurde mit Hilfe einer Multiplex-PCR untersucht werden. Die erarbeiteten Ergebnisse können folgendermaßen zusammengefaßt werden.

Für die *In-vitro*-Induktion von  $\alpha_E\beta_7$  auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten ist die Gegenwart von TGF- $\beta_1$  entscheidend. Die Stimulation mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$  führte bei maximal 30% der Zellen zu einer  $\alpha_E\beta_7$ -Expression. Darüber hinaus konnte kein weiterer Stimulus indentifiziert werden, der zu einer signifikanten Mehrexpression führt. Im TGF- $\beta_1$ -reichen Milieu, wie es bei Lungenfibrose vorherrscht, könnte es somit zu einer Verschiebung zu Gunsten von  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten kommen, was einerseits die Akkumulation dieses Phänotyps in



der Lunge und andererseits die niedrige  $\alpha_E\beta_7$ -Expressionsrate auf Blutlymphozyten erklären würde.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Bedeutung des Engagements des T-Zell-Rezeptors (TZR) für die Induktion des  $\alpha_E\beta_7$ -Antigens nachgewiesen werden. Die direkte immunomagnetische Separation von  $CD4^+$ -T-Lymphozyten, bei der es bereits während des Reinigungsvorganges zu einer Aktivierung des TZR via  $CD4$ -Co-Rezeptor-Aktivierung kommt, führt zu einer signifikant höheren  $\alpha_E\beta_7$ -Expression, als die indirekte Separation, bei der dieses zusätzliche Signal fehlt.

Um den Phänotyp dieser distinkten  $CD4^+$ -T-Zell-Population genauer zu charakterisieren, wurden neben  $\alpha_E\beta_7$  noch weitere Oberflächenantigene untersucht. Der überwiegende Teil  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten exprimierte ebenfalls das  $CD25$ -Antigen. Bei diesem Phänotyp  $\alpha_E\beta_7^+/CD25^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten handelt es sich möglicherweise um sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg), die aktiv in die fibrosierende Entzündungsreaktion eingreifen, indem sie andere Zellen sowohl in Proliferation als auch Zytokinproduktion supprimieren.

Inflammatorische Zytokine spielen bei fibrotischen Prozessen eine Rolle, daher wurde mit Hilfe einer Multiplex-PCR die Genexpression mehrerer Zytokine und deren Rezeptoren in  $CD4^+$ -T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Separationsmethode und der exogenen Aktivierung bestimmt. Die indirekt isolierten Zellen zeigten dabei deutlich weniger aktivierte Gene als direkt gereinigte. Die wesentlichen Unterschiede fanden sich in der mRNA-Expression von IL-6-R, den TNF- $\alpha$ -Rezeptoren (TNF-p75 und TNF-p55), sowie IL-1 $\beta$ .

Die Analyse der Genexpression von den Subpopulationen  $\alpha_E\beta_7^-$  und  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten hinsichtlich des Einflusses der Selektionsmethode wies Ergebnisse, vergleichbar mit direkt isolierten  $CD4^+$ -T-Lymphozyten, auf. Sie zeigten eine starke mRNA-Expression von IL-6-R, TNF-p55 und TNF-p75. Der deutlichste Unterschied zwischen beiden Subpopulationen konnte in der IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression nachgewiesen werden.  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten exprimierten das Gen wesentlich stärker als der  $\alpha_E\beta_7$ -negative Subtyp.

Bei TGF- $\beta_1$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  handelt es sich um Zytokine, denen eine profibrogene Wirkung zugeschrieben wird. Durch Produktion und Sekretion dieser Zytokine sind  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten selbst in der Lage, eine fibrosierende Entzündung zu initiieren und in Gang zu halten.

## 2 Einleitung

### 2.1 Interstitielle Lungenfibrosen

Unter Fibrose versteht man einen irreversiblen bindegewebig-narbigen Umbau von Funktionsgewebe infolge chronisch-entzündlicher Prozesse.

Interstitielle Lungenfibrosen umfassen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch einen diffusen fibrotischen Umbau des funktionstüchtigen Lungenparenchyms auf dem Boden einer chronischen Alveolitis charakterisiert sind.

Ein Teil der Erkrankungen tritt im Rahmen von Kollagenosen, Pneumokoniosen, einer Hypersensitivitätspneumonitis oder einer Sarkoidose auf. Pulmonale Fibrosen können auch durch bestimmte Medikamente (z.B. Bleomycin, Methotrexat, Amiodaron) hervorgerufen werden oder stellen eine Komplikation der Strahlentherapie dar.

Die Ätiologie der übrigen Lungenfibrosen ist nicht bekannt. Man faßt diese als Idiopathische Pulmonale Fibrosen (IPF) zusammen. Die IPF ist eine Ausschlußdiagnose und bildet mit 20-30% eine relativ große Gruppe innerhalb der pulmonalen Fibrosen.

#### 2.1.1 Pathologische Klassifikation der IPF

Viele Jahre lang galt die pathologisch-anatomische Einteilung der IPF nach Liebow (77) als klassische Differenzierungsgrundlage. Er unterteilte die interstitiellen Pneumonien anhand spezifischer histologischer Kriterien in 5 Gruppen.

Basierend auf dieser Einteilung, stellten Katzenstein und Myers 1998 eine neue Klassifikation auf. Danach umfassen vier Formen der idiopathischen interstitiellen Pneumonie das morphologische Spektrum, das durch den Begriff der IPF abgedeckt wird (62).

Die häufigste Form (über 60 % aller IPF) stellt die *Gewöhnliche Interstitielle Pneumonie* (usual interstitial pneumonia – UIP) dar. Am zweithäufigsten kommt die *Nicht-spezifische Interstitielle Pneumonie* (NSIP) vor, wohingegen die *Desquamative Interstitielle Pneumonie* (DIP / respiratory bronchiolitis interstitial lung disease – RBILD) und die *Akute Interstitielle Pneumonie* (DIP / Hamman-Rich-Syndrom) relativ selten auftreten (47).

Diese vier Formen lassen sich histologisch voneinander unterscheiden. Dabei bilden die jeweiligen Unterschiede in Verteilung, Intensität und dem Erscheinungsbild von Fibrose und Entzündung die Basis der Klassifizierung. Das Ausmaß und die Zusammensetzung zellulärer Infiltrate im Alveolarraum bzw. im Parenchym helfen bei der Zuordnung.

Katzenstein sieht in der inkorrekten Abgrenzung der genannten vier Formen voneinander eine mögliche Erklärung für die Vielfalt im klinischen Bild der IPF und für das unterschiedliche Ansprechen auf medikamentöse Therapien. Die richtige Zuordnung stellt damit ein wichtiges Kriterium dar, um Prognosen besser abschätzen und therapeutische Maßnahmen effektiver einsetzen zu können. Die Grundlage hierfür bildet letztendlich ein besseres Verständnis der Pathogenese der IPF.

### **2.1.2 Pathobiologie der IPF**

Bei der Lungenfibrose kommt es zu einer quantitativen Zunahme des interstitiellen Bindegewebes. Dadurch verlängert sich zum einen die Diffusionsstrecke für den Gasaustausch, zum anderen verliert das Lungengerüst an Elastizität. Beides führt zu einem fortschreitenden Funktionsverlust der Lunge.

Klinisch zeigt der betroffene Patient eine progrediente Dyspnoe und trockenen Reizhusten, eine Reduktion der statischen Lungenvolumina und der Diffusionskapazität, sowie die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie. Die Erkrankung schreitet im allgemeinen rasch fort und führt durch einen weitgehenden fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms irreversibel zur respiratorischen Globalinsuffizienz. In diesem Stadium sind alle therapeutischen Maßnahmen ausgeschöpft. Allenfalls eine Transplantation kommt dann noch in Frage.

Die Lungenfibrose tritt als Folge einer Gewebsschädigung auf und ist fast immer mit einer alveolären Entzündungsreaktion assoziiert (38,20,21,35). Im Rahmen der per definitionem noch nicht geklärten Alveolarschädigung werden Alveolarmakrophagen aktiviert, und es wandern Blutmonozyten in die Alveolen ein. Diese Zellen sezernieren Entzündungsmediatoren, wodurch wiederum andere Zellen (z.B. neutrophile Granulozyten) in der Lungenendstrombahn hängenbleiben (27,5,38,108) und in die Alveolen auswandern.

Die Entzündungszellen setzen Proteasen, zytotoxische Sauerstoffverbindungen und Eikosanoide frei. Das hat zur Folge, daß Alveozyten und Kapillarendothelien der Lunge geschädigt werden. Die Schädigung der Lungenkapillaren setzt einen alveolären

Entzündungsprozeß in Gang, der sich zunächst als exsudative Alveolitis manifestiert und vom alveolären auf das extraalveoläre Interstitium übergreift. Aktivierte Alveolarmakrophagen sezernieren fibrosefördernde Faktoren, wie Fibronektin, PDGF und IGF-1, und stimulieren Fibroblasten zur Proliferation und Kollagensynthese (121,9). Die exsudative Alveolitis geht damit in eine fibrosierende über. Das Kapillarbett verödet und die Alveolen werden entweder durch kubische Regeneratepithelien ausgekleidet oder in ein Narbenfeld umgewandelt. Da der Entzündungsprozeß jedoch im Lungeninterstitium weiterschwelt, schreitet die Zerstörung weiterer Alveolen voran. Diese werden in zunehmendem Maße durch wuchernde Myofibroblasten organisiert, bis schließlich das Lungenparenchym nur noch aus breiten Narbenfeldern (muskuläre Lungenzirrhose) mit zystischen epithelialisierten Hohlräumen (Wabenlunge) besteht (123).

In den letzten Jahren wird die Rolle der Entzündungsreaktion als Promotor der Fibrose immer mehr in Frage gestellt (69,44,47,138,141). So sieht man inzwischen in der fortwährenden Epithelschädigung und dem Außerkontrollierten der Reparaturprozesse den eigentlichen Mechanismus. Unterstützt wird diese Theorie beispielsweise durch Beobachtungen aus Tierversuchen.  $\alpha^V\beta_7$ -Knockout-Mäuse, die durch diesen Gendefekt das TGF- $\beta_1$  nicht aktivieren können, entwickeln nach Bleomycin-Exposition eine schwere pulmonale Entzündungsreaktion, jedoch ohne pulmonale Fibrose (99). Andere Versuche mit Zelllinien zeigen, daß eine Überexpression von aktiviertem TGF- $\beta_1$  in Epithelzellen der Lunge eine progressive Fibrose verursacht, jedoch ohne erkennbare Zeichen einer Entzündung (143). Die klinische Erfahrung, daß viele IPF-Patienten auf die Therapie mit hochpotenten, antiinflammatorisch wirksamen Medikamenten überhaupt nicht ansprechen, läßt ebenfalls an einer alleinigen zentralen Rolle der Entzündung in der Fibrogenese zweifeln.

Sollte sich diese Hypothese bestätigen, dann liegt der Schlüssel für wirksame Therapieansätze weniger darin, die Entzündung zu beherrschen. Vielmehr müßte es dann das Ziel sein, die Epithelschädigung und die außer Kontrolle geratenen Reparaturprozesse, also v.a. die persistierende Fibroblastenaktivierung und –proliferation, zu stoppen (32).

Charakteristisch für die Ausbildung einer Lungenfibrose ist die vermehrte Produktion und Ablagerung von extrazellulärer Matrix am Ort der Entzündung durch aktivierte, proliferierende Fibroblasten (38,32,47).

Die Aktivierung von Bindegewebszellen geht einher mit der verstärkten Genexpression für Kollagene, Fibronektin, Proteoglykanen und anderen Matrixbestandteilen.

Es ist anzunehmen, daß sich ebenfalls das Expressionsmuster für Matrixrezeptoren sowie für Matrix abbauende Enzyme und Inhibitoren verändert.

Sowohl ortsständige Zellen als auch Zellen, die in das Entzündungsgebiet einwandern, steuern diese fibroproliferative Reaktion durch Produktion und Sekretion einer Vielzahl von Zytokinen und Entzündungsmediatoren.

## 2.2 Intraepitheliale Lymphzyten

Epithelien stellen eine natürliche Abgrenzung des Organismus von seiner Umwelt dar. Sie ermöglichen dabei nicht nur den Stoff- und Gasaustausch, sondern schützen den Körper auch effektiv vor dem Eindringen pathogener Keime und schädlicher Stoffe.

Gerade weil das Epithel in direktem Kontakt zur Umgebung steht, wie beispielsweise im Gastrointestinal- oder Respirationstrakt, werden an die lokale Immunabwehr besondere Anforderungen gestellt. Lymphozyten spielen dabei eine wesentliche Rolle.

Im Epithel finden sich spezialisierte T-Zellen, sogenannte intraepitheliale Lymphozyten (IEL), die nahezu ausschließlich hier vorkommen (125,142). Verglichen mit Lymphozyten anderer Provenienz legt die Lokalisation, aber auch der distinkte Phänotyp der IEL, eine spezielle Funktion dieser Zellen nahe, wie aus verschiedenen klinischen Beobachtungen sowie Tierversuchen hervorgeht (90,18,54,68). In engem Zusammenspiel mit Epithel- und Mesenchymzellen übernehmen IEL eine definierte Funktion bei der Organisation lokaler immunologischer Überwachungsmechanismen.

In den Atemwegen verteilen sich auf etwa 100 kernhaltige Epithelzellen 20 bronchiale Lymphozyten (42), die bevorzugt im suprabasalen Bereich des Epithels sowie der Lamina propria lokalisiert sind. Es handelt sich dabei in erster Linie um  $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten, denen nur ein kleiner Teil von 1 bis 2% an  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten gegenüber steht. Innerhalb der Population der  $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten dominiert der CD8-T-Phänotyp. Dabei beträgt das Verhältnis zwischen  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Lymphozyten im gastrointestinalen Epithelgewebe 1:10 und im bronchialen Epithel 4:10 (41).

Die IEL unterscheiden sich von Lymphozyten aus anderen Bereichen des Körpers durch die Expression bestimmter Oberflächenmarker, die mit der T-Zellaktivierung und Differenzierung assoziiert sind. An der Rekrutierung und der Akkumulation der Lymphozyten im Epithelgewebe ("homing") sind nach heutigem Verständnis sowohl chemotaktische Faktoren (vor allem Chemokine) als auch Adhäsionsmoleküle beteiligt.

## 2.3 Integrine

Integrine bilden eine große Familie heterodimerer Glycoproteine und bestehen jeweils aus einer  $\beta$ - und einer  $\alpha$ -Kette. Derzeit sind 14  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Ketten bekannt. Obwohl diese Zahlen auf eine große Anzahl von Dimer-Kombinationen schließen läßt, wurden bisher nur 20 Kombinationen identifiziert (52,51). Das hängt damit zusammen, daß viele  $\alpha$ -Ketten nur an eine einzige  $\beta$ -Einheit binden können. Dieser Umstand ermöglicht die Unterteilung der Integrine in Unterfamilien. Drei Hauptgruppen von Oberflächenmolekülen sind bekannt und werden im Folgenden aufgezählt (1):

- $\alpha_1$  oder VLA (very late activation)

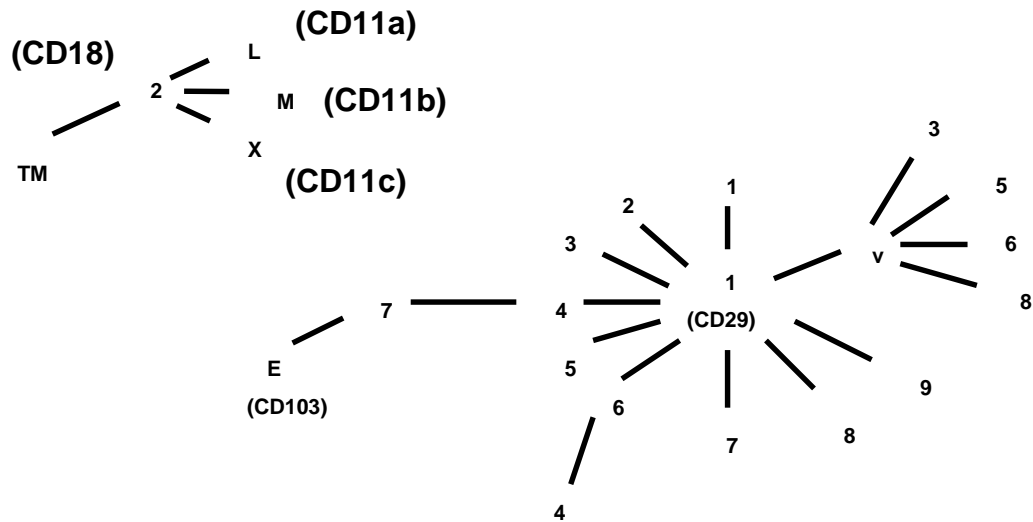
Die Moleküle kommen in verschiedenen Geweben vor und interagieren vor allem mit Proteinen der Extrazellulären Matrix (Laminin, Kollagen, Fibronectin). Sie spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und Zellmigration während der Embryogenese.

- $\alpha_2$  ("Leukozyten-Integrine")

Diese Unterfamilie wird ausschließlich auf Leukozyten exprimiert und vermittelt hauptsächlich die Immunadhärenzphänomene.

- $\alpha_3$  ("Zytoadhäsion")

Moleküle dieser Gruppe finden sich auf der Oberfläche von Endothelzellen sowie Thrombozyten und haben ähnliche Liganden und Funktionen wie die VLA-Gruppe.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Integrinfamilie**

Im Schaubild sind die bisher bekannten Dimer-Kombinationen zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten im Überblick dargestellt. Die Linien kennzeichnen jeweils, welche Ketten aneinander binden. Sofern einem Molekül in der CD-Nomenklatur eine Bezeichnung zugeteilt wurde, ist diese in Klammer angegeben.

Die meisten Integrine werden auf den verschiedensten Zellen exprimiert, und viele Zellen exprimieren mehrere unterschiedliche Integrine (52,40). Die Funktion der Integrine ist weit gestreut. So vermitteln sie die Adhäsion zwischen Zellen untereinander bzw. zwischen Zellen und der Extrazellulärmatrix. Darüber hinaus sind sie an der Antigenerkennung beteiligt und agieren als Co-Stimulationsfaktor bei der T-Zell-Aktivierung (1,40). Somit nehmen sie eine zentrale Rolle bei der Initiierung von Immunantwort und Entzündungsreaktionen ein.

Einige Integrine werden auf der Zelloberfläche von Epithelien und Lymphozyten exprimiert. Sie dienen der Orientierung und Funktion immunkompetenter Zellen im Gewebe (43). Vermutlich beeinflussen sie die Migration bzw. Akkumulation von T-Lymphozyten und stehen in Zusammenhang mit dem Homing dieser Zellen in vielen Oberflächenepithelien. Beispielsweise akkumulieren T-Lymphozyten, die den MadCAM-1-Rezeptor ( $\alpha_4\beta_7$ -Integrin) und den TECK-Rezeptor (CCR9) exprimieren, bevorzugt im intestinalen Epithelgewebe (2,3,164). Die Expression des lymphozytären Adhäsionsmoleküls CLA ("Cutaneous Lymphocyte Antigen") und des Chemokins CTACK ("Cutaneous T cell-Attracting Chemokine") vermittelt die Migration einer definierten T-Zellsubpopulation in die Dermis. T-

Lymphozyten aus psoriatischen Läsionen exprimieren neben CLA und dem Chemokin-Rezeptor CXCR3 das  $\alpha_E\beta_7$ -Antigen auf ihrer Oberfläche (127).

### 2.3.1 Das Integrin $\alpha_E\beta_7$

Die Erstbeschreibung geht auf die Entdeckung eines neuen Antigens humaner Schleimhautlymphozyten zurück. Dieses Oberflächenmolekül ließ sich mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen das "human mucosal lymphocyte antigen-1" (HML-1) auf allen Zellen aller Klassen humaner intestinaler intraepithelialer Lymphozyten (iIEL) nachweisen. Dagegen fanden sich nur wenige HML-1 positive Zellen anderer lymphoider Kompartimente (30).

Die weitere Differenzierung der HML-1 positiven Zellen zeigte, daß bis zu 95% aller intraepithelialen Lymphozyten (IEL), 40% aller Lamina propria Lymphozyten (LPL) und nur 2% aller peripheren Blutlymphozyten (PBL) dieses Antigen besitzen. Die HML-1 positiven PBL ließen sich als aktivierte Lymphozyten ( $CD45RO^+$ -Zellen oder "memory"-Zellen) charakterisieren. Der Nachweis, daß aktivierte Lymphozyten HML-1 exprimieren, konnte auch in vitro geführt werden. Hierbei wurde nach Stimulation der PBL (Tuberkulin, Tetanustoxin) auf der Zelloberfläche HML-1 und CD25 nachgewiesen (132). Auch die Stimulation der PBL mit  $TGF-\beta_1$ , einem von Epithelzellen sezernierten Zytokin, induzierte eine vermehrte Expression von HML-1 (113).

Untersuchungen zur Struktur von HML-1 zeigten eine biochemische Verwandtschaft der  $\alpha$ -Kette des dimeren Moleküls zu VLA-4. Dieses zur Gruppe der "very late" Antigene ( $\beta_1$ ) gehörende Integrin wird zwar auf HML-1 positiven Zellen exprimiert, aber durch den monoklonalen Antikörper selbst nicht erfaßt (29). Erst weitergehende Analysen des HML-1-bindenden Antigens mittels Immunpräzipitation deckten die Struktur des Proteins, bestehend aus einer 175 kDa  $\alpha$ -Kette ( $\alpha_E$ ) und einer 110 kDa  $\beta$ -Kette ( $\beta_7$ ) auf und ermöglichten somit die Zuordnung des HML-1 Moleküls zur Familie der Integrine (140). Auf der sechsten internationalen Nomenklatur-Konferenz der "cluster of differentiation" (CD) wurde  $\alpha_E$  der Name CD103 zugeteilt. Die Tatsache, daß man diese  $\alpha$ -Kette bisher immer nur in Verbindung mit  $\beta_7$  nachweisen konnte, führte dazu, daß die meisten Autoren das Gesamtmolekül  $\alpha_E\beta_7$  mit CD103 gleichsetzen und in ihren Arbeiten beide Bezeichnungen synonym verwenden.

Die Integrin-Kette  $\beta_7$  bildet mit zwei unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten die heterodimeren Oberflächenmoleküle  $\alpha_4\beta_7$  (CD49d, VLA-4) und  $\alpha_E\beta_7$  (CD103).  $\alpha_4\beta_7$  bindet an das



---

MadCAM-1-Adhäsionsmolekül und vermittelt das Homing von Lymphozyten in den Peyerschen Plaques (15,23), während das  $\alpha_E\beta_7$ -Antigen über E-Cadherin die Akkumulation der Lymphozyten im Epithelzellgewebe organisiert (22).

### 2.3.2 $\alpha_E\beta_7$ -exprimierende T-Lymphozyten

Es finden sich Hinweise dafür, daß  $\alpha_E\beta_7$ -exprimierende T-Lymphozyten die Entzündung subepithelialen Gewebes und des angrenzenden Parenchyms beeinflussen. Beispielsweise zeigen  $\alpha_E\beta_7$ -Knockout-Mäuse eine verminderte Zahl intraepithelialer T-Lymphozyten (133). Wenn man bei IL-2-Knockout-Mäusen experimentell eine Colitis induziert, so exprimieren intraepitheliale Lymphozyten im Kolon verstärkt  $\alpha_E\beta_7$ . Verabreicht man diesen Mäusen nach Manifestation der Colitis monoklonale Antikörper gegen das Integrin, so gehen die Entzündungsprozesse in der Mucosa deutlich zurück und die Zahl  $\alpha_E\beta_7^+$ -T-Lymphozyten in der Lamina propria sinkt. Dabei sind es vor allem  $CD4^+$ -T-Lymphozyten, die in diese Prozesse involviert sind, während  $CD8^+$ - oder  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in Anzahl oder Expressionsmuster keine Veränderungen aufweisen (82).

Die verschiedenen Subpopulationen von T-Lymphozyten zeigen auch untereinander deutliche Unterschiede im Hinblick auf ihre  $\alpha_E\beta_7$ -Expression. So sind  $CD8^+$ - und  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) zu einem hohen Prozentsatz  $\alpha_E\beta_7$ -positiv, unabhängig davon, ob eine Lungenerkrankung vorliegt oder nicht (17).  $CD4^+$ -T-Lymphozyten exprimieren bei fibrosierenden Lungenerkrankungen  $\alpha_E\beta_7$ , bei Gesunden sind sie  $\alpha_E\beta_7$ -negativ. Blutlymphozyten zeigen eine  $\alpha_E\beta_7$ -Expression von <5%. Selbst bei Fibrosepatienten mit einem Anteil von 60-80%  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten in der BALF, exprimieren die Blutlymphozyten kaum  $\alpha_E\beta_7$  (124,81).

## 2.4 Die Rolle $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Rahmen pulmonaler Fibrosen

In *In-vivo*-Experimenten konnte beobachtet werden, daß  $\alpha_E\beta_7$ -exprimierende CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei interstitiellen Lungenerkrankungen expandieren und mit dem Grad des fibrotischen Lungenparenchyumbaus korrelieren (18,17,81,124). Diese Expansion ist auf interstitielle Lungenerkrankungen begrenzt und findet sich z.B. nicht im Rahmen einer eosinophilen Bronchitis bei Asthma bronchiale. Vor allem interstitiell fibrotische Prozesse der Lunge zeigen eine Expansion dieser T-Zell-Subpopulation, d.h. bei anderen Erkrankungen des Lungenparenchyms, beispielsweise der Pneumonie, tritt diese nicht auf.

Die funktionelle Bedeutung der  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei pulmonalen Fibrosen wurde bisher nicht untersucht. Auch über die für die Expansion dieser Subpopulation verantwortlichen Faktoren ist nur wenig bekannt. So wird das Engagement des CD3-Rezeptors oder TGF- $\beta_1$  mit der Hochregulierung der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression in Verbindung gebracht (124). Ein Ausmaß der Expansion der Zellen, wie sie *in vivo* bzw. fibrotischen Lungenerkrankungen beobachtet wird, ist allerdings bisher *in vitro* nicht gelungen.

### 3 Zielsetzung

Bei der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression finden sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen T-Zell-Subpopulationen. Während  $CD8^+$ - und  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten aus der BALF das Integrin unabhängig von einer Erkrankung stark exprimieren, zeigen  $CD4^+$ -T-Lymphozyten nur bei fibrosierenden Lungenerkrankungen eine erhöhte  $\alpha_E\beta_7$ -Expression. Eine weitere Beobachtung ist, daß bei Patienten mit pulmonaler Fibrose BALF- $CD4^+$ -T-Lymphozyten vermehrt  $\alpha_E\beta_7$  exprimieren, deren Blutlymphozyten jedoch nicht ( $<5\%$ ) (124,16,81).

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, das Expressionsverhalten von  $CD4^+$ -T-Lymphozyten im Hinblick auf  $\alpha_E\beta_7$  zu analysieren. Dabei ging es im einzelnen um folgende Aspekte:

- Welche Faktoren und Co-Stimulationen führen auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten zur Expression von  $\alpha_E\beta_7$ ? Bisher ist darüber nur wenig bekannt. Die Identifikation beteiligter Stimuli ließe jedoch Rückschlüsse auf mögliche Reaktionsabläufe bei pulmonalen Fibrosen zu. Dies könnte so zum besseren Verständnis der Prozesse verhelfen, die über  $\alpha_E\beta_7$  vermittelt werden.
- Bei Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen waren bis zu 80% der BALF- $CD4^+$ -T-Lymphozyten  $\alpha_E\beta_7$ -positiv. Läßt sich *in vitro* bei  $\alpha_E\beta_7^-/CD4^+$ -Blut-Lymphozyten z.B. durch verschiedene Stimuluskombinationen eine ähnlich hohe Expression erzielen? Dieser Ansatz könnte helfen, die an der fibrogenen Entzündung beteiligten Faktoren zu identifizieren.
- Unterscheiden sich  $\alpha_E\beta_7^+$ - von  $\alpha_E\beta_7^-$ -Zellpopulationen? Die selektive Expansion  $\alpha_E\beta_7^+$ -T-Lymphozyten im Rahmen fibröser Lungenkrankheiten läßt vermuten, daß  $\alpha_E\beta_7^+$ -Zellen definierte funktionelle Eigenschaften besitzen. Diese möglichen Unterschiede sollen hier aufgezeigt werden.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

Analysenwaage BP 610	Sartorius, Göttingen, FRG
FACSCalibur	Becton Dickinson, New Jersey, USA
FACS-Auswertungssoftware CellQuest 3.1f	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, FRG
Kochplatte mit Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Kelheim, FRG
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau, FRG
Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss, Jena, FRG
Präzisionswaage BP 61	Sartorius, Göttingen, FRG
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel, FRG
Steri-Cult 200 Inkubator	Forma Scientific, Frankfurt, FRG
Sterilbank Hera Safe	Haereus, Hanau, FRG
Tischzentrifuge Rotana 96 RS	Hettich, Tuttlingen, FRG
Tischzentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen, FRG
Vakusafe-Absaugsystem	Integra Biosciences, Fernwald, FRG
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA

#### 4.1.2 Chemikalien

Agarose LE	Roche, Mannheim, FRG
Borsäure	Sigma, Deisendorf, FRG
Bovines Serum Albumin	Sigma, Deisenhofen, FRG
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, FRG
Chloroform	Sigma, Deisenhofen, FRG

---



---

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen, FRG
Dulbecco's PBS w/o $\text{Ca}^{2+}$ $\text{Mg}^{2+}$	Cell Concepts, Umkirch, FRG
EDTA	Boehringer, Mannheim, FRG
Ethanol	Sigma, Deisenhofen, FRG
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim, FRG
Fetal calf serum	GIBCO Grand Island, NY, USA
Ficoll-Paque PLUS	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Glyzerin	Sigma, Deisenhofen, FRG
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen, FRG
L-Glutamin (lyophil)	Seromed, Biochrom, Berlin, FRG
Light Green SF Yellowish	Fluka Chemika, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, FRG
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen, FRG
Penicillin/Streptomycin	Boehringer, Mannheim, FRG
RPMI-Medium	Cell Concepts, Umkirch, FRG
Saponin	Sigma, Deisenhofen, FRG
Taq-Polymerase	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
Toluidinblau O	Fluka Chemika, Buchs, Schweiz
TriPure <sup>TM</sup>	Boehringer, Mannheim, FRG
Tris-HCl	Boehringer, Mannheim, FRG
Xylenzyanol	Sigma, Deisenhofen, FRG

Alle verwendeten Substanzen waren von höchstem verfügbarem Reinheitsgrad.

#### **4.1.3 Antikörper**

CD103-FITC (BerACT8)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD103-PE (BerACT8)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD25-FITC (M-A251)	Pharmingen, San Diego, USA
CD120b-FITC (htr9)	BMA, Augst, Schweiz
CD95-PE (DX2)	Pharmingen, San Diego, USA
CD69-FITC (CH/4)	Pharmingen, San Diego, USA
CD3-Cy5 (UCHT1)	Dako, Glostrup, Dänemark

---



---

CD4-APC (RPA-T4)	Pharmingen, San Diego, USA
mIgG1 neg. control (FITC/RPE/RPE-Cy5)	Dako, Glostrup, Dänemark
anti-CD3 LE/NA (HIT 3a)	Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD4 (13B8.2)	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD29 (Lia 1\2)	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD28 (ANC28.1/5D10)	Ancell, Bayport, USA
anti-CD11b (BEAR1)	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-VLA-4 (HP 2/1)	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD103 (Ber-ACT8)	Dako, Glostrup, Dänemark
anti-mouse IgG	ICN Biomedicals, Eschwege, FRG

#### 4.1.4 Zytokine

rh Interleukin-2	Cell Concepts, Umkirch, FRG
rh Interleukin-15	Cell Concepts, Umkirch, FRG
rh Transforming growth factor- $\beta_1$	Cell Concepts, Umkirch, FRG

#### 4.1.5 Primer

PCR-Primer für Cyclophilin:

Spezifischer F-Primer: CATCTGCACTGCCAAGACTG

Spezifischer R-Primer: CTGCAATCCAGCTAGGCATG

PCR-Primer für  $\alpha_E\beta_7$ :

Spezifischer F-Primer: AGGGTGTTGAGCGCTTTGCCATTG

Spezifischer R-Primer: GAGCCCCCGCGACGTAGGAGAG

#### 4.1.6 Puffer

Coating Puffer:

- 0,795 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,159% entspricht 15 mM)
- 1,465 g  $\text{NaHCO}_3$  (0,293% entspricht 35 mM)
- 100 mg  $\text{NaN}_3$  (0,020% entspricht 3 mM)

Die Lösung wurde mit Aqua bidest auf 500 ml aufgefüllt, auf einen pH von 9,6 eingestellt und vor Gebrauch steril filtriert.

10 x Tris/Borat/EDTA (TBE)-Puffer:

- 0,89 M Tris-HCl
- 0,89 M Borsäure
- 0,025 M EDTA

Die Lösung wurde auf einen pH von 8,0 eingestellt und vor Gebrauch autoklaviert. Als Lösungsmittel verwendete man Aqua bidest.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Separation von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

#### 4.2.1.1 *Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut*

Die Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Vollblut (PBMC) erfolgte in Anlehnung an die von Rihs et al. beschriebene Methode (124). Hierzu wurden 36 ml Blut gesunder Spender in EDTA-Röhrchen (1,6 mg/ml Blut, Sarstedt, Nümbrecht, FRG) abgenommen, 1:2 mit PBS verdünnt, dann je 25 ml dieser Suspension auf 20 ml Ficollösung der Dichte 1.077 g/L geschichtet und 30 Minuten mit 400 x g bei 20° C zentrifugiert.

Das verdünnte Plasma wurde bis zur Interphase abgesaugt und die mononukleären Zellen aus der Interphase sauber abgenommen. Die so gewonnenen Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen (10 Minuten, 350 x g, 4° C) und das Zellpellet anschließend in PBS mit 2 % FCS aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Kimura-Färbung .

#### Zellfärbung mit Kimura

Zur differentiellen Zellfärbung wurde ein Volumenteil Zellsuspension mit neun Volumenteilen der alle 14 Tage frisch angesetzten Kimuralösung vermischt und mindestens 60 Sekunden stehen gelassen. Die Zählung erfolgte in einer verbesserten Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim/Main, FRG) im Lichtmikroskop. Dabei entsprach ein mittleres Zählfeld  $1 \times 10^4$  Zellen. Die Färbelösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 11,0 ml Toluidinblau-Lösung bestehend aus 0,05 g Toluidinblau, 1,8% NaCl und 96% Ethanol ad 100 ml Wasser; das entspricht 0,05% Toluidinblau in der Endlösung
- 5 ml Phosphatpuffer pH 6,4 (Endkonzentration von 0,066 M)
- 0,8 ml light green (0,03% in der Endlösung entsprechend)
- 0,5 ml Saponin, gesättigt in 50% Ethanol

Nach dem Ansetzen wurde die Lösung gut gemischt, durch einen 0,45 µm Filter (Millex-HV Sterilfilter, Millipore, Bedford, MA, USA) steril filtriert und bei 4° C gelagert.



#### 4.2.1.2 *Magnetische Zellseparation*

CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden von anderen Subtypen entweder durch negative oder positive Selektion in einer immunmagnetischen Separierung nach der von Miltenyi et al. (92) entwickelten Methode getrennt. Grundlage der Trennung ist die unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen auf den verschiedenen Zelltypen bzw. -subtypen. Mit Antikörpern, an die kleinste kolloidale, paramagnetische Partikel (“beads”) gekoppelt sind, lassen sich unter Zuhilfenahme eines starken Magneten die CD4<sup>+</sup>-Zellen von den übrigen Zellarten trennen.

In der vorgelegten Arbeit wurde das Magnetic Cell Sorting (MACS)-System (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, FRG) zur Separierung benutzt. Es besteht aus einem starken, U-förmigen Magneten, in den Säulen eingehangen werden können. Bei der Separierung bleiben die mit “beads” beladenen Zellen in der Säule hängen, während sich alle nichtbeladenen Zellen aus der Säule eluieren lassen. Je nach Wahl der Separationsmethode (negativ/positiv) befinden sich die Zielzellen nach Durchlauf der PBMC-Zellsuspension durch die Säule entweder im Eluat oder in der Säule. Zellen, die in der Säule zurückgehalten werden, können mit Hilfe eines Kolbens, nach Herausnahme der Säule aus dem Magneten, gewonnen werden. Mit beiden Methoden wurden Reinheitsgrade der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten von 95 bis 98% erreicht.

##### Positive (direkte) Selektion

Für 10<sup>7</sup> Zellen (totale Zellzahl), die in 80 µl PBS/2%FCS resuspendiert wurden, benötigte man 20 µl magnetische “beads” der Firma Miltenyi (CD4 MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, FRG). Das Zellgemisch wurde mit den “beads” 15 Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend gab man die Suspension auf eine in den Magneten eingespannte Säule (LS Separationssäule, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, FRG), deren Eisenmatrix vollständig mit PBS/2%FCS benetzt war. Ein Filter (Pre-Separation Filter, 30µm, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, FRG), der auf die Säule aufgesetzt wurde, verhinderte, daß Zellklumpen und -aggregate die Säule verstopften und die Reinheit der Zellpopulation verminderten.

Nach dem Einsickern des Zellgemisches in die Matrix wurden die nicht mit “beads” besetzten Zellen großzügig mit 20 bis 30 ml PBS/2%FCS eluiert und die Säule anschließend aus dem Magneten entnommen. Mit Hilfe eines Kolbens konnten die in der Säule zurückgehaltenen, mit “beads” besetzten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten herausgespült werden.

Die Separationssäulen dienten nur zum einmaligen Gebrauch, da die Eisenmatrix von einem hydrophilen Mantel umgeben ist, der sich durch das Spülen auswäscht. Darüberhinaus ist es nicht möglich, die Säule luftblasenfrei zu spülen, was die Voraussetzung für einen einwandfreien zweiten Gebrauch wäre.

#### Negative (indirekte) Selektion

Für die negative Selektion wurde das CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, FRG) verwendet, bestehend aus einem Hapten-Antikörper Cocktail und MACS Anti-Hapten MicroBeads.

Während bei der positiven Selektion die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten direkt magnetisch markiert werden, zielen bei der negativen Selektion die verschiedenen Hapten-konjugierten Antikörper auf alle CD4<sup>+</sup>-Zellen. Die anschließende Bindung von Anti-Hapten Antikörpern, die mit den kolloidalen, paramagnetischen MicroBeads konjugiert sind, führt dazu, daß CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Säule zurückgehalten werden, CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten die Säule jedoch ungehindert passieren können.

Für 10<sup>7</sup> Zellen (totale Zellzahl), die in einem Volumen von 80 µl aufgenommen wurden, verwendete man 20 µl Hapten-Antikörper Cocktail. Nach 10 Minuten Inkubation bei 4° C wurde die Zellsuspension 2 x mit PBS/2%FCS gewaschen (10 Minuten, 300 x g, 4° C). Das Zellpellet aus PBMC wurde erneut resuspendiert und mit 20 µl MACS Anti-Hapten MicroBeads pro 10<sup>7</sup> Zellen für 15 Minuten bei 4° C inkubiert. Nach einmaligem Waschen nahm man die Zellen in 500 µl PBS/2%FCS pro 10<sup>8</sup> Zellen auf und gab die Zellsuspension unter Verwendung eines Filters auf die Säule.

Die nicht mit "beads" besetzten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden mit 20 bis 30 ml PBS/2%FCS eluiert, zentrifugiert und nach Auszählung der Zellzahl entsprechend in Medium aufgenommen.

#### **4.2.2 Separation von E 7<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten**

Zunächst wurden CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wie oben beschrieben direkt separiert und anschließend für 7 Tage mit anti-CD3 (1 µg/ml) und TGF-β<sub>1</sub> (10 ng/ml) bei 37° C inkubiert. Am Tag 2 nach Stimulation wurde der Zellkultur IL-2 (10 ng/ml) zugegeben.

Am 7. Tag nach Stimulation erfolgte erneut die Ficoll-Separation (siehe 3.2.1.1), um abgestorbene Zellen zu eliminieren. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl PBS/FCS aufgenommen und mit 10 µl anti-Mouse-α<sub>E</sub> für 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Die Zellen

wurden einmal mit PBS/FCS gewaschen und danach 50  $\mu$ l Rat-anti-MouseIgG MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, FRG) für 15 Minuten bei Zimmertemperatur zugegeben. Die Zellsuspension wurde auf die Magnetsäule gegeben. Bei den Zellen, die in der Säule hängenblieben, handelte es sich um die  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen. Im Eluat befanden sich die  $\alpha_E\beta_7^-/CD4^+$ -T-Lymphozyten. Beide Zell-Subpopulationen wurden zentrifugiert und nach Bestimmung der Zellzahl entsprechend in Medium aufgenommen.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Subpopulationen mußten die Zellen vor der Färbung mit markierten Antikörpern zunächst mit anti-mIgG geblockt werden. Im Durchflußzytometer wurde anschließend die Oberflächenexpression von  $\alpha_E\beta_7$ , CD3, CD4 gemessen. Der Reinheitsgrad der so gewonnenen Zellpopulationen erreichte 90 bis 95%.

### 4.2.3 Zellkultur

Isolierte  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$ /ml in RPMI mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin in Kultur gehalten.

Vor Bestücken der Multiwell Kulturplatten (12-well, Becton Dickinson, New Jersey, USA) mit den gereinigten Zellen wurden die Wells mit anti-Maus IgG beschichtet (Coating), um die Quervernetzung von CD3 mit dem T-Zell-Rezeptor zu begünstigen.

Dazu verwendete man Goat- $\alpha$ -mouse IgG (1 mg/ml, ICN-Cappel, Cat.No. 55479) in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml Coating Puffer. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37° C wurden die Wells 2 x gründlich mit PBS gespült und anschließend die Zellkultur angesetzt.

Je nach Art der Co-Stimulation wurden die Zellen mit den unterschiedlichsten Antikörpern bzw. Zytokinen stimuliert. Im ersten Schritt erfolgte die Zugabe der Antikörper (1 $\mu$ g/ml anti-CD3, 1 $\mu$ g/ml anti-CD4, 1 $\mu$ g/ml anti-CD29, 1 $\mu$ g/ml anti-CD28, 1 $\mu$ g/ml anti-CD11b, 1 $\mu$ g/ml VLA-4). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C bzw. 37°C wurden die Zellen 1 x mit RPMI-Medium gewaschen. Dieses Vorgehen (Vorinkubation) diente dazu, lösliche Antikörper zu binden und durch das Waschen aus der Zellkultur zu eliminieren. Erst danach wurden Zytokine der Zellkultur zugegeben (10 ng/ml TGF- $\beta_1$ , 25 ng/ml IL-15). Im Brutschrank verblieben die Zellkulturen bei 37°C für längstens 7 Tage nach Stimulation.

Am zweiten Tag nach Stimulation wurde zu allen Zellen Interleukin-2 in einer Endkonzentration von 10 ng/ml zugegeben. Damit sollte ein zu schnelles Absterben der Zellen verhindert werden.

---

#### 4.2.4 Durchflußzytometrie

Unter Durchflußzytometrie versteht man die Analyse einer Zellpopulation mittels Laserbestrahlung hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und bestimmter Oberflächenmoleküle. Zur qualitativen und semiquantitativen Untersuchung von Membranmolekülen können Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen, die an monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene gekoppelt sind, markiert werden. Während der Messung werden die Zellen in eine dünne Kapillare gesaugt, so daß ein Strom einzelner Zellen entsteht. Dieser Strom wird von einem Laserstrahl, der Licht einer bestimmten Wellenlänge (z.B. 488 nm, 635 nm) ausstrahlt, erfaßt. Photodetektoren (Photomultiplier) messen die Lichtstreuung in Form von Vorwärtsstreuung (Maß für die Größe) und Seitwärtsstreuung (Maß für die Granularität) sowie die emittierten Photoquanten der Fluoreszenzfarbstoffe.

Als Durchflußzytometer wurde ein FACSCalibur verwendet, der gleichzeitig drei verschiedene Fluoreszenzen erfassen kann. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittiert grünes Licht der Wellenlänge 503 nm, Phycoerythrin (PE) oranges Licht von 585 nm. Phycoerythrin-Cyanine 5 (PE-Cy5) und Allophycocyanin (APC) emittieren Licht bei 682 nm und 670 nm Wellenlänge. Überlappende Absorptionsbereiche lassen sich durch eine bestimmte Geräteeinstellung kompensieren. Aufgrund dieser Parameter erlaubt der FACSCalibur die gleichzeitige Messung einer durch Größe, Granularität und spezifische Oberflächenmarker definierten Zellpopulation.

##### Markierung von Zelloberflächenmolekülen:

Gereinigte CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden in Multiwell Kulturplatten (Becton Dickinson, New Jersey, USA) kultiviert, anschließend in 5 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, FRG) überführt, je 10 µl Fluoreszenz-markierter Antikörper hinzugegeben und für eine halbe Stunde im Dunkeln bei Zimmertemperatur inkubiert. Die verwendeten Antikörper hatten alle eine Konzentration von 1 bis 5 µg/ml in PBS mit 0,1% Natriumazid und 2% FCS. Danach wurde einmal mit 2 ml PBS/2%FCS gewaschen (5 Minuten, 300 x g, 4° C), das Pellet schließlich in 300 µl PBS/2%FCS aufgenommen und die Probe sofort gemessen.

##### Phänotypische Analyse von Oberflächenantigenen:

Zur Auswertung wurde die FACS-Auswertungssoftware CellQuest 3.1f von Becton Dickinson verwendet. Die Messung erfolgte mit Hilfe zweier "gates". Als Region R1 wurde die Lymphozytenpopulation, als Region R2 CD4<sup>+</sup>-Zellen definiert. Gemessen wurde die

---

Zellmenge, die sowohl in R1 als auch in R2 auftauchte, um eine möglichst reine Population CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu erhalten. Es wurden 10000 Zellen in dieser Region gezählt. Die so selektierten Lymphozyten ließen sich nach dem Fluoreszenzverhalten der gebundenen monoklonalen Antikörper unterteilen. Die Spezifität der Antikörperbindung wurde durch die Färbung mit isotypengleichen Mausimmunglobulinen kontrolliert.

## **4.2.5 Nachweis von mRNA-Expression**

### **4.2.5.1 Isolierung von Total-RNA**

Die RNA-Isolierung erfolgte unter RNase-freien Bedingungen, die verwendeten Lösungen und Reaktionsgefäße aus Polypropylen wurden vorher autoklaviert, sterilverpackte Einmalartikel unbehandelt verwendet.

Ein RNA-Isolierungsansatz umfaßte mindestens  $5 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Die Zellkultivierung erfolgte in 24er well-Kulturschalen (Becton Dickinson, New Jersey, USA) in RPMI mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin für 4 bzw. 24 Stunden. Die Zellen wurden nach direkter bzw. indirekter Separation entweder unstimuliert, unter alleiniger anti-CD3-Stimulation (1 µg/ml) oder unter Stimulation mit 1 µg/ml anti-CD3 und 10ng/ml TGF-β<sub>1</sub> in Kultur gesetzt.

Die Extraktion von Total-RNA erfolgte unter Verwendung von TriPure<sup>TM</sup>. Die Zellsuspension aus den Kulturschalen wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 750 x g 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend saugte man den Überstand ab und nahm das Pellet in 1000 µl TriPure<sup>TM</sup> pro 5 bis  $10 \times 10^6$  Zellen auf. Nach erfolgter Zellyse und gründlicher Durchmischung inkubierte man das Gemisch 5 Minuten bei Raumtemperatur, um eine vollständige Dissoziation der Nukleinsäure-Protein-Komplexe zu gewährleisten. Die Probe wurde mit 200 µl Chloroform pro eingesetzten 1000 µl TriPure<sup>TM</sup> versetzt, 15 Sekunden lang gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die resultierenden zwei Phasen wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation mit 12000 x g bei 4° C getrennt und die obere, die RNA enthaltende, wäßrige Phase vorsichtig - ohne Beschädigung der proteinhaltigen Interphase - in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA gab man 500 µl Isopropanol zu und inkubierte das Gemisch nochmals 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer Zentrifugation mit 12000 x g über 10 Minuten bei 4° C wurde der Überstand abgenommen, die RNA mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft

getrocknet. Das Pellet wurde schließlich in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und 15 Minuten lang auf 60° C erhitzt. Danach ließ sich die Probe entweder bei -70° C lagern oder direkt in cDNA umschreiben.

#### 4.2.5.2 *Reverse Transkription*

Isolierte Total-RNA wurde mit dem ProStar™ First Strand RT-PCR-Kit (Stratagene, Heidelberg, FRG) in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde von der in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommenen RNA 38 µl für die Umschreibung entnommen. Nach Zugabe von 3 µl oligo(dT)primer (100 ng/µl) und vorsichtigem Durchmischen folgte eine 5-minütige Inkubation bei 65° C im Heizblock zur Auflösung der Sekundärstrukturen. Den Ansatz ließ man anschließend langsam bei Raumtemperatur abkühlen, um den Primern die Bindung an die RNA zu ermöglichen. Danach fügte man folgende Komponenten in entsprechender Reihenfolge zu:

- 5 µl 10x first strand buffer
- 1 µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)
- 2 µl 100 mM dNTPs
- 1 µl MMLV-RT (50 U/µl)

Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und anschließend zur Erststrangsynthese 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Im Anschluß inaktivierte man die reverse Transkriptase durch 5-minütige Inkubation bei 90° C im Heizblock. Die entstandenen Produkte wurden bei -80° C gelagert. Aliquots von 1 bis 5 µl fanden für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Verwendung.

#### 4.2.5.3 *Polymerase-Ketten-Reaktion*

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, mit der spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* mit hoher Ausbeute amplifiziert werden können. Sie wurde 1983 von K. B. Mullis entdeckt und das Originalprotokoll 1985 publiziert (129). Die Reaktion besteht aus drei sich wiederholenden Teilschritten, die bei unterschiedlichen Temperaturen stattfinden. Im ersten Schritt werden die DNA-Doppelstränge bei hoher Temperatur denaturiert. Es folgt der Hybridisierungsschritt, bei dem die Oligonukleotidprimer mit den denaturierten Strängen hybridisieren und so der DNA-Polymerase im dritten Schritt (Kettenverlängerungsschritt) als Primer dienen können. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des von den Primern eingerahmten Matrizenfragmentes, das dann im folgenden Zyklus als Ausgangs-DNA dient.

1988 wurde aus der Bakterienart *Thermus aquaticus* eine hitzestabile Polymerase (Taq-Polymerase) isoliert, die längere Zeit Temperaturen von 94° C zu überstehen vermag, wodurch sich die Amplifikationsmöglichkeiten verbessern lassen (56).

In dieser Arbeit wurde die CytoXpress<sup>TM</sup> Multiplex PCR<sup>®</sup> (BioSource International, Camarillo, CA, USA) verwendet. Diese PCR-Methode setzt mehrere Primerpaare gleichzeitig ein und ermöglicht damit die simultane Amplifikation unterschiedlicher DNA-Sequenzen im gleichen Reaktionsgefäß. Die Primerpaare haben ähnliche Schmelzpunkte (T<sub>m</sub>), so daß für alle vergleichbare Bedingungen während der Multiplex PCR (MPCR) herrschen. Die Zusammensetzung der MPCR-Puffer ist optimiert, um die Konkurrenz zwischen den Amplicons möglichst gering zu halten und die Amplifikation von längeren DNA-Fragmenten zu verstärken.

Mit dem human Inflammatory Gene Set 3 (hINF3-MPCR) wurde die Expression der Gene für TNF- $\alpha$ , TNFR-1, TNFR-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-6R, GM-CSF und GM-CSFR untersucht. Als Haushaltsgen, zu dessen Expression die der anderen Gene in Beziehung gesetzt wurden, diente GAPDH.

<b>Primer</b>	<b>Zielgen</b>	<b>Schmelzpunkt sense,antisense</b>	<b>Produktgröße (bp)</b>
hINF3-TNF	humanes TNF- $\alpha$	66°C, 66°C	680
hINF3-TNFR1	humanes TNFR-1	66°C, 66°C	490
hINF3-TNFR2	humanes TNFR-2	66°C, 66°C	220
hINF3-IL1	humanes IL-1 $\beta$	70°C, 71°C	555
hINF3-IL6	humanes IL-6	72°C, 73°C	360
hINF3-IL6R	humanes IL-6R	72°C, 73°C	300
hINF3-GMC	humanes GM-CSF	72°C, 73°C	424
hINF3-GMCR	humanes GM-CSFR	69°C, 70°C	607
hINF3-GAP	humanes GAPDH	63°C, 64°C	921

---

Die hINF3-MPCR wurde in einem 50  $\mu$ l Ansatz durchgeführt, der aus 5  $\mu$ l cDNA und 45  $\mu$ l MPCR-Mastermix bestand. Der MPCR-Mastermix setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 30,5  $\mu$ l destilliertes Wasser
- 5  $\mu$ l 10 x hINF3G MPCR Buffer
- 5  $\mu$ l 10 x hINF3G MPCR Primer
- 4  $\mu$ l dNTP (3,12 mM)
- 5  $\mu$ l Taq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

45  $\mu$ l des MPCR-Mastermix wurden mit 5  $\mu$ l cDNA in 0,6 ml Reaktionsgefäßen vermischt und scharf zentrifugiert. Die PCR erfolgte im Thermozykler (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) und umfaßte folgende Phasen:

- Initialphase (1 Zyklus), bestehend aus
  - 5 Minuten bei 95° C zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge
- Hauptphase, in der die Amplifikation stattfand (30 Zyklen), bestehend aus
  - 1 Minute bei 95° C zur Denaturierung
  - 1 Minute bei 62° C zur Hybridisierung
  - 1 Minute bei 72° C zur Kettenverlängerung
- Finalphase, in der eine letzte, 10-minütige Kettenverlängerung bei 72° C erfolgte

Die MPCR-Produkte wurden im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Neben diesem Multiplex Primerset kamen außerdem spezifische Cyclophilin- und  $\alpha_E\beta_7$ -Primer zur Anwendung. Auch diese PCR wurde in einem 25  $\mu$ l Ansatz durchgeführt, der aus 5  $\mu$ l cDNA und 20  $\mu$ l PCR-Mastermix bestand. Der dafür eingesetzte PCR-Mastermix enthielt:

- 13,37  $\mu$ l DEPC-Wasser
- 2,5  $\mu$ l 10 x Puffer
- 1  $\mu$ l Primer (F), Endkonzentration 400 nM
- 1  $\mu$ l Primer (R), Endkonzentration 400 nM
- 2  $\mu$ l dNTPs, Endkonzentration 200  $\mu$ M
- Taq-Polymerase 5000 U/ml, Endkonzentration 25 U/ml



---



---

Die PCR umfaßte folgende Phasen:		<b>Cyclophilin</b>	<b>E 7</b>
1. Initialphase:	5 min	95° C	95° C
2. Hauptphase:	1 min	95° C	95° C
(30 Zyklen)	1 min	60° C	62° C (35 Zyklen)
	1 min	72° C	72° C
3. Finalphase:	10 min	72° C	72° C

Zur Verifikation gleicher cDNA-Mengen der einzelnen Proben erfolgte zunächst von allen Proben eine Cyclophilinamplifikation. Die PCR-Produkte wurden im Kühlschrank bei 4° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Sie hatten bei Verwendung der spezifischen Cyclophilinprimer eine Länge von 326, bei Verwendung der  $\alpha_E\beta_7$ -Primer eine Länge von 447 Basenpaaren (bp).

#### 4.2.5.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten

Zur Gelelektrophorese wurde ein 2,5% Agarosegel in 1 x TBE-Puffer verwendet. Die Lösung wurde aufgekocht, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren, das Gel nach Abkühlung auf ungefähr 60° C in dem Schlitten der Gelelektrophoresekammer gegossen und sofort ein oder zwei Kämme zur Bildung der Probentaschen eingesetzt. Nach der Aushärtung wurde der Gelschlitten in die mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und die Kämme wurden entfernt. Man vermischte je 5 µl der PCR-Proben mit 0,1 Volumenteil des 10 x Probenauftragspuffers (0,42% Bromphenolblau, 0,42% Xylenzyanol, 50% Glycerin) und pipettierte sie vorsichtig in die Geltaschen. Nach einer 180-minütigen elektrophoretischen Auftrennung mit 100 Volt und 200 mA wurde das Gel für 20 Minuten in einer 0,001% Ethidiumbromidlösung in 1 x TBE-Puffer unter beständigem Schütteln gefärbt, anschließend in destilliertem Wasser 10 Minuten gespült und mit kurzweiligem UV-Licht beleuchtet. Zur Dokumentation diente das Geldokumentationssystem mit der Software Phoretix ID Advanced Version 4.01 von Biostep (Jahnsdorf, FRG).

#### **4.2.6 Statistik**

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die statistische Auswertung unter Verwendung der SPSS 10.5-Software erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für gepaarte Ergebnisse. Bei nicht verbundenen Stichproben mit unterschiedlichen n-Zahlen fand der U-Test nach Mann & Whitney Anwendung. Als signifikant wurde ein  $p < 0,05$  angesehen.

## 5 Resultate

### 5.1 Kinetik der $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

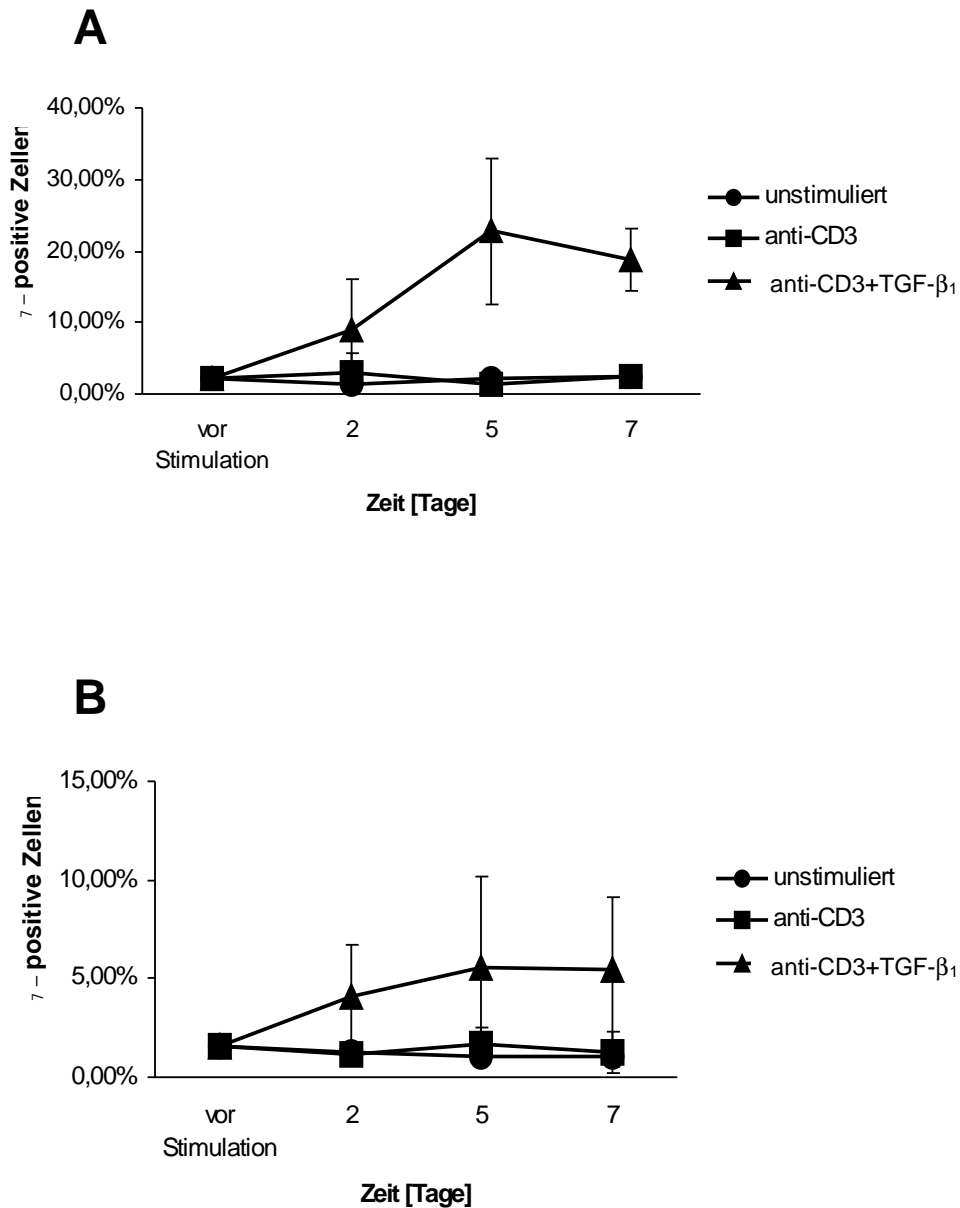
Es sollte ermittelt werden, wie sich eine Population CD4-positiver (CD4<sup>+</sup>) T-Lymphozyten aus dem Blut bezüglich der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression im zeitlichen Verlauf verhält. Dazu wurden diese T-Zellen nach Isolierung und Reinigung mit anti-CD3 (1µg/ml) bzw. mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) aktiviert und in Kultur genommen. Ein Teil der Zellen blieb unstimuliert und diente als Kontrolle. Zu verschiedenen Zeitpunkten (vor Stimulation, 2., 5. sowie 7. Tag nach Stimulation) wurde die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mittels Durchflußzytometrie gemessen.

Abbildung 5.1A stellt die Kinetik der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression nach direkter immunomagnetischer Separation von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten dar. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt exprimierten unstimulierte Zellen nur wenig  $\alpha_E\beta_7$  (<3%). Die alleinige Inkubation mit anti-CD3 führte ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der zellulären  $\alpha_E\beta_7$ -Expression (<3%). In Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  ließ sich eine deutliche Induktion von  $\alpha_E\beta_7$  an der Oberfläche der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachweisen. Die maximale Expression war nach 5 Tagen erreicht (22,80%  $\pm$  10,25% gegenüber 8,88%  $\pm$  7,26% am 2. Tag) und fiel anschließend wieder ab (18,76%  $\pm$  4,43% am 7. Tag).

Nach indirekter Separation (Abbildung 5.1B) zeigte sich ebenfalls, daß die T-Lymphozyten erst in Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$   $\alpha_E\beta_7$  an ihrer Zelloberfläche exprimierten. Die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf Kontrollzellen (<2%) unterscheidete sich kaum von der mit anti-CD3 stimulierten Zellen (<2%). Vom Zeitpunkt Null bis zum 5. Tag kam es wiederum zu einem stetigen Anstieg der Expression von  $\alpha_E\beta_7$  (2.Tag: 4,04 %  $\pm$  2,63%; 5.Tag: 5,57%  $\pm$  4,57%). An Tag 7 nahm die Zahl  $\alpha_E\beta_7$ -positiver Zellen gegenüber Tag 5 nur geringfügig ab (5,41%  $\pm$  3,75%).

Vergleicht man die Ergebnisse aus Abbildung 5.1A und 5.1B miteinander, so zeigte sich eine, unabhängig von der Separationsmethode, gleich verlaufende Kinetik der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression, mit einem Maximum an Tag 5 nach Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$ . Ein deutlicher Unterschied bestand jedoch in der Höhe der relativen Anzahl  $\alpha_E\beta_7$ -positiver Zellen.

Während bei direkter Magnetseparation mehr als 20% der Zellen  $\alpha_E\beta_7$  exprimierten, lag die Rate nach indirekter Separation unter 6%.



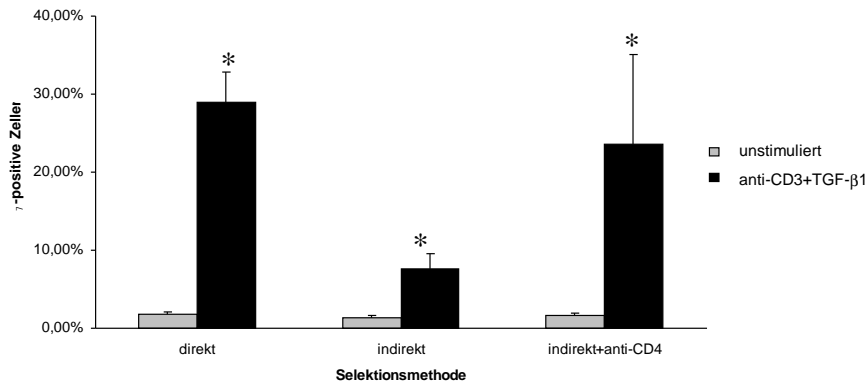
**Abbildung 5.1: Kinetik der  $E_7$ -Expression nach direkter (A) und indirekter (B) Magnetzellseparation.**  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Isolation und Reinigung für eine Dauer von 2, 5 und 7 Tagen mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 oder mit anti-CD3 und 10  $\text{ng/ml}$  TGF- $\beta_1$  stimuliert und ihre  $E_7$  Expression im Durchflußzytometer bestimmt. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwerte ( $n=3$ ) des relativen Anteils  $E_7$ -positiver Zellen  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt.

Aufgrund dieser Ergebnisse konzentrierten sich die weiteren Messungen auf den 5. Tag nach Stimulation, da sich zu diesem Zeitpunkt die maximale Induktion von  $\alpha_E\beta_7$  nachweisen ließ. Anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  wurde als Grundstimulation festgelegt, da hiermit der Anteil der  $\alpha_E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -Zellen am höchsten war. Neben den unstimulierten Zellen diente diese Stimulation als Positivkontrolle bei allen weiteren Versuchsansätzen.

## 5.2 Einfluß von der Selektionsmethode auf die $\alpha_E\beta_7$ -Expression

In den Versuchsansätzen zur Kinetik wurde bereits deutlich, daß sich das Expressionsverhalten  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Selektionsmethode unterschied. Nach direkter Separation exprimierte ein deutlich höherer Anteil der Zellen  $\alpha_E\beta_7$  an der Zelloberfläche, als nach indirekter Separation. Im Folgenden sollte der Einfluß der Selektionsmethode näher untersucht werden.

Dazu wurden  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen nach Isolierung aus dem Vollblut entweder mittels direkter oder indirekter immunomagnetischer Separation von den übrigen T-Zell-Subpopulationen getrennt. Es erfolgte die Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$ . Neben diesen Ansätzen wurden Zellen in Kultur genommen, die indirekt separiert, aber zusätzlich zur Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  mit anti-CD4 aktiviert wurden. Damit sollte der Effekt der direkten Separation "imitiert" werden. Denn es war anzunehmen, daß die Bindung der mit Magnetbeads markierten anti-CD4-Antikörper an die Oberflächenantigene der  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen für den Effekt der direkten Magnetseparation verantwortlich waren. Am 5. Tag nach Stimulation wurde die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression im Durchflußzytometer gemessen.



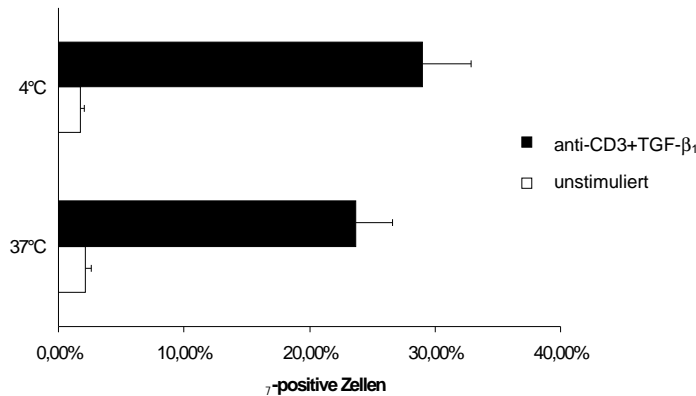
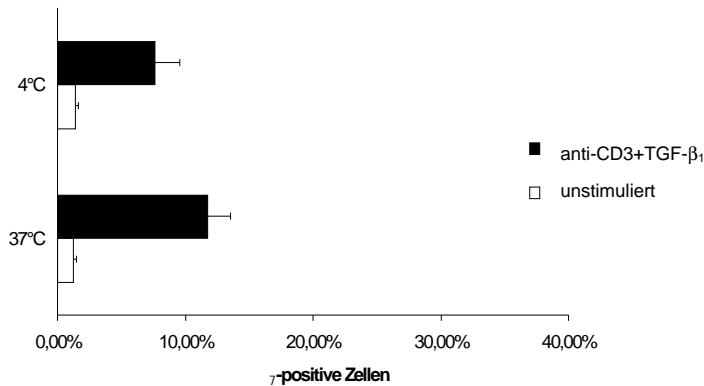
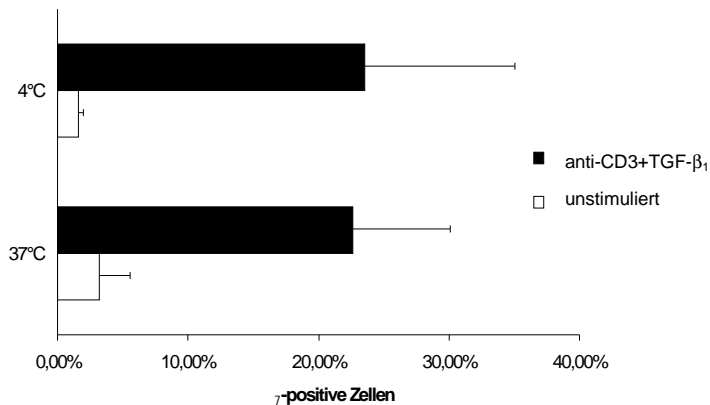
**Abbildung 5.2:** Einfluß der Selektionsmethode auf die  $\gamma$ -Expression. Nach Isolierung aus Vollblut wurden  $CD4^+$ -T-Lymphozyten entweder durch direkte oder indirekte immunomagnetische Separation von den übrigen T-Zellen getrennt und mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  für 5 Tage inkubiert. Ein Teil der indirekt separierten Zellen erhielt neben dieser Stimulation noch zusätzlich anti-CD4 (1 $\mu$ g/ml). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt (direkt: n=13; indirekt: n=14; indirekt+anti-CD4: n=6). Unabhängig von der Selektionsmethode zeigte sich bei stimulierten Zellen eine deutlich erhöhte  $\gamma$ -Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen (\*). Die  $\gamma$ -Expression war nach direkter Separation signifikant höher als nach indirekter Separation ( $p < 0,001$ ). Zwischen indirekter Separation mit zusätzlicher anti-CD4-Stimulation und direkter bzw. indirekter Separation ergab sich statistisch kein Unterschied.

In der vorgelegten Arbeit wurde erstmals ausführlich nachgewiesen, daß sich in der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression nach Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  ein deutlicher Unterschied zwischen direkt (n=13) und indirekt (n=14) separierten Zellen zeigt (Abbildung 5.2). Während nach direkter Reinigung 28,97%  $\pm$  3,92% der T-Zellen  $\alpha_E\beta_7$ -positiv wurden, exprimierten nach indirekter Separation lediglich 8,92%  $\pm$  1,94% der Zellen  $\alpha_E\beta_7$ . Die Differenz zeigte eine deutliche Signifikanz ( $p < 0,001$ ). Die Gegenwart von anti-CD4 erhöhte bei indirekt isolierten Zellen die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf 23,52%  $\pm$  11,49% (n=6). Eine zusätzliche anti-CD4-Aktivierung ergab weder zu den direkt, noch zu den indirekt separierten Zellen, einen statistisch signifikanten Unterschied.

### 5.3 $\alpha_E\beta_7$ -Expression in Abhängigkeit von sequentieller Aktivierung

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten erstmals, daß die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten unter entscheidendem Einfluß der Selektionsmethode stand. Wie man im vorhergehenden Abschnitt erkennen konnte, ließ sich nach indirekter Magnetseparation der Anteil  $\alpha_E\beta_7$ -positiver Zellen durch die zusätzliche Stimulation mit anti-CD4 fast auf das Niveau der Zellen nach direkter Separation erhöhen. Es lag nahe anzunehmen, daß das Engagement des T-Zell-Rezeptors durch die Bindung der MicroBeads an die  $CD4^+$ -Zellen während des Separationsvorganges ein zusätzliches Aktivierungssignal für die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression darstellt. Aus diesem Grunde sollte nun geklärt werden, ob eine sequentielle Aktivierung, im Sinne einer zeitlich verschobenen Stimulation, das Expressionseigenschaften der Zellen verändert.

Dazu wurden Lymphozyten aus Vollblut isoliert und die  $CD4^+$ -Zellen entweder direkt oder indirekt separiert. Es folgte eine Vorinkubation der Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen. Das bedeutet, daß  $CD4^+$ -T-Zellen nach Zugabe von anti-CD3 ( $1\mu\text{g/ml}$ ) für 30 Minuten entweder bei  $4^\circ\text{C}$  oder  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend ein Mal mit Medium gewaschen wurden. Bei indirekt isolierten Zellen, die zusätzlich mit anti-CD4 stimuliert werden sollten, wurde das anti-CD4 ( $1\mu\text{g/ml}$ ) gleichzeitig mit anti-CD3 im Rahmen der Vorinkubation zugegeben. Erst danach erfolgte die Zugabe von  $\text{TGF-}\beta_1$  ( $10\text{ ng/ml}$ ). Am 5. Tag nach Stimulation wurde die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression im Durchflußzytometer gemessen.

**A****B****C**

### Abbildung 5.3: Einfluß der sequentiellen Aktivierung auf die $E\gamma$ -Expression

Lymphozyten wurden aus Vollblut isoliert und die  $CD4^+$ -T-Zellen entweder direkt (A) oder indirekt (B) separiert. Nach Zugabe von anti-CD3 ( $1\mu\text{g/ml}$ ) wurden die Zellen für 30 Minuten entweder bei 4°C oder 37°C inkubiert und anschließend einmalig mit Medium gewaschen wurden. Bei indirekt isolierten Zellen mit zusätzlicher anti-CD4-Aktivierung (C), wurde das anti-CD4 ( $1\mu\text{g/ml}$ ) gleichzeitig mit anti-CD3 im Rahmen der Vorinkubation zugegeben. Erst danach erfolgte die Exposition mit TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml). Am 5. Tag nach Stimulation wurde die  $E\gamma$ -Expression durchflußzytometrisch gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt. A zeigt  $E\gamma^+$  Zellen nach direkter Separation. Eine Signifikanz zwischen einer Vorinkubation bei 4°C ( $n=13$ ) gegenüber 37°C ( $n=7$ ) ergab sich nicht. Auch bei indirekt separierten Zellen (B;  $n=14$  bei 4°C,  $n=8$  bei 37°C) sowie indirekt isolierten Zellen mit zusätzlicher anti-CD4-Stimulation (C;  $n=6$  bei 4°C,  $n=5$  bei 37°C) ließ sich zwischen 4°C und 37°C kein signifikanter Unterschied in der  $E\gamma$ -Expression erheben. Mit  $p<0,001$  bei 4°C vorinkubierten Zellen bzw.  $p=0,009$  bei 37°C zeigte sich bei direkt separierten Zellen (A) eine signifikant höhere  $E\gamma$ -Expression im Vergleich zu indirekt separierten Zellen (B). Die zusätzliche Stimulation mit anti-CD4 (C) ergab weder eine signifikante Änderung bzgl. der Vorinkubation, noch zeigten sich signifikante Unterschiede gegenüber den Ergebnissen direkt und indirekt separierter Zellen.



In Abbildung 5.3 sind die Ergebnisse der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression unter Einfluß der sequentiellen Aktivierung dargestellt. Mit den Versuchen sollte geklärt werden, ob sich je nach Vorinkubationstemperatur (4°C oder 37°C) das Expressionsverhalten der Zellen bzgl.  $\alpha_E\beta_7$  verändert. Bei den Ansätzen wurde die Selektionsmethode mitberücksichtigt.

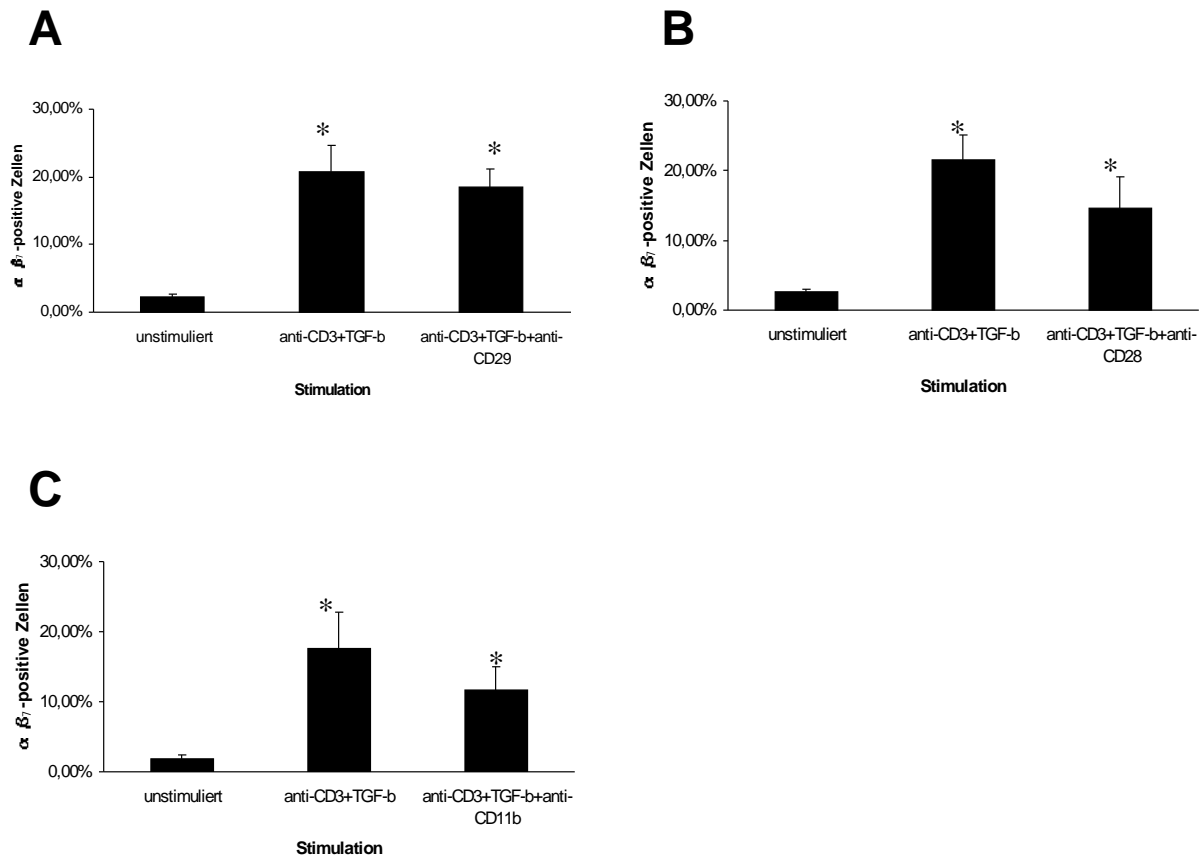
Unstimulierte Zellen exprimierten am 5. Tag nur wenig  $\alpha_E\beta_7$  an ihrer Oberfläche (<2%) und zeigten dabei weder in Abhängigkeit von der Selektionsmethode (Abbildung 5.3 A-C) noch von der Inkubationstemperatur (4°C bzw. 37°C) einen signifikanten Unterschied in der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression.

Nach Exposition mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  waren direkt isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (5.3A) nach einer 4°C-Vorinkubation (n=13) zu 28,97%  $\pm$  3,92%  $\alpha_E\beta_7$ -positiv, bei 37°C (n=7) exprimierten 23,70%  $\pm$  2,89%  $\alpha_E\beta_7$ . Der Anteil  $\alpha_E\beta_7$ -positiver Zellen nach indirekter Separation (5.3B) lag lediglich bei 8,92%  $\pm$  1,94% (4°C, n=14) sowie bei 11,78%  $\pm$  1,74% (37°C, n=8). Die Verminderung der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf indirekt gereinigten Zellen war unabhängig von der Inkubationstemperatur statistisch signifikant zu direkt separierten Zellen (4°C: p<0,001; 37°C: p=0,009). CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, die nach indirekter Isolierung zusätzlich mit anti-CD4 stimuliert wurden (5.3.C), wiesen zwischen der Vorinkubation bei 4°C (23,52%  $\pm$  11,49%; n=6) und bei 37°C (22,65%  $\pm$  7,48%; n=5) keinen signifikanten Unterschied auf. Im Vergleich zu den Daten direkt (A) und indirekt (B) isolierter Zellen war eine signifikante Änderung der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression ebenfalls nicht nachzuweisen.

## 5.4 $\alpha_E\beta_7$ -Expression unter Einfluß zusätzlicher Stimuli

In Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  nahm der Anteil  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auf maximal 30% zu. Das entspricht etwa der Expansionsverteilung von CD4<sup>+</sup>-Blutlymphozyten bei Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen aus der BALF dieser Patienten waren jedoch bis zu 80%  $\alpha_E\beta_7$ -positiv (124).

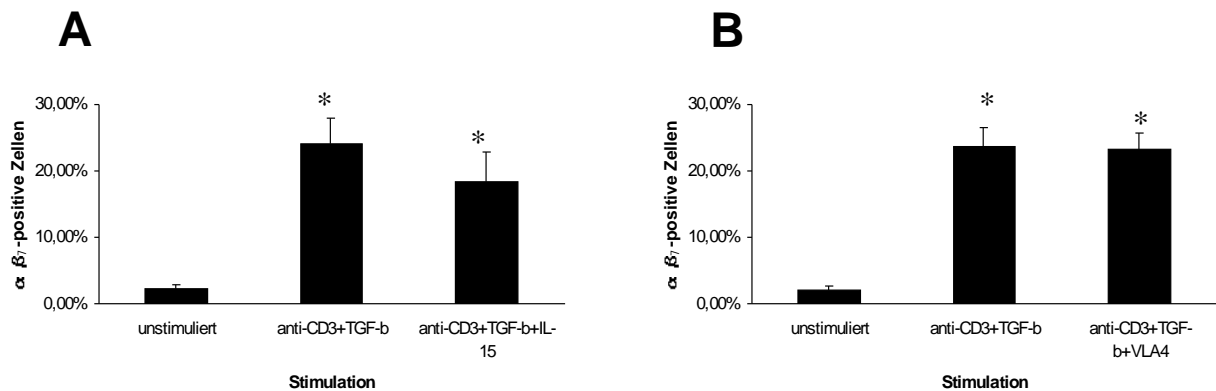
Im folgenden wurde daher versucht, durch zusätzliche Stimulation mit Antikörpern bzw. Zytokinen die Expansion der  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten über 30% weiter zu steigern.



**Abbildung 5.4:** Einfluß auf die  $\alpha_E \beta_7$ -Expression durch Stimulation mit zusätzlichen Antikörpern.  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Isolation und Reinigung mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 und 10 ng/ml TGF- $\beta_1$  stimuliert. Zusätzlich erfolgte die Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD29 (A), 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD28 (B) oder 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD11b (C). Am 5. Tag wurde die  $\alpha_E \beta_7$ -Expression im Durchflußzytometer bestimmt. Zur Darstellung kommen die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler  $\alpha_E \beta_7$ -positiver Zellen in Prozent. In allen drei Abbildungen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen (\*). Die zusätzliche Exposition der Zellen mit anti-CD29 (A), anti-CD28 (B) oder anti-CD11b (C) ergab im Vergleich zur alleinigen Aktivierung mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  keine signifikante Änderung.

Abbildung 5.4 zeigt den Einfluß zusätzlicher Antikörper auf die Induktion von  $\alpha_E \beta_7$ . 5.4A (n=8) stellt den Vergleich dar zwischen der alleinigen Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  und der zusätzlichen Exposition mit anti-CD29. Während bei der Kontrolle nur 2,36%  $\pm$  0,40% der Zellen  $\alpha_E \beta_7$ -positiv waren, führten anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  zu einer  $\alpha_E \beta_7$ -Expression von 20,84%  $\pm$  3,72%. In Gegenwart von anti-CD29 ließ sich auf 18,40%  $\pm$  2,70% der Zellen  $\alpha_E \beta_7$  nachweisen. Der Unterschied in der  $\alpha_E \beta_7$ -Expression zwischen der Kontrolle und den aktivierten Zellen war in beiden Fällen deutlich signifikant (p=0,012). Die zusätzliche Stimulation mit anti-CD29 änderte jedoch das Expressionsmuster nicht signifikant gegenüber anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  allein.

Wurden die Zellen zusätzlich mit anti-CD28 (B; n=5) bzw. anti-CD11b (C; n=5) inkubiert, exprimierten  $14,55\% \pm 4,58\%$  bzw.  $11,75\% \pm 3,21\%$  der Zellen das  $\alpha_E\beta_7$ -Antigen. Verglichen mit der Expression in Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  (B:  $21,52\% \pm 3,68\%$ ; C:  $17,63\% \pm 5,15\%$ ) zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression der Zellen nach Stimulation mit anti-CD28 (B) oder anti-CD11b (C) war signifikant höher als in der Kontrolle (p=0,043).



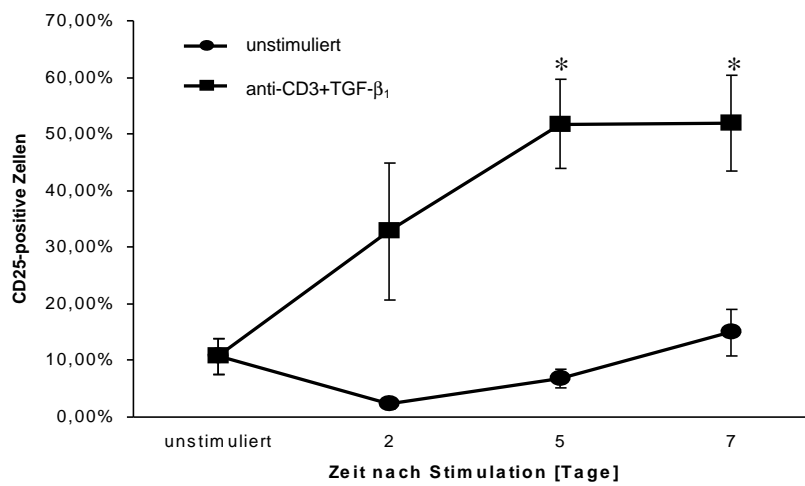
**Abbildung 5.5: Einfluß von IL-15 und anti-VLA-4 auf die anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -induzierte  $\alpha_E\beta_7$ -Expression.**  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Isolation und Reinigung mit  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 und  $10 \text{ ng/ml}$  TGF- $\beta_1$  stimuliert. Zusätzlich erfolgte die Inkubation mit  $25 \text{ ng/ml}$  IL-15 (A) und  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-VLA-4 (B). Am 5. Tag wurde die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression im Durchflußzytometer bestimmt. Zur Darstellung kommen die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler  $\alpha_E\beta_7$ -positiver Zellen in Prozent. Während der Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen signifikant war (\*), führte die zusätzliche Exposition der Zellen mit IL-15 (A) bzw. anti-VLA4 (B) zu keiner signifikanten Änderung im Expressionsverhalten.

Als nächstes wurde der Einfluß von IL-15 (5.5A) und anti-VLA-4 (5.5B) auf die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression untersucht. Anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  führten zu  $24,17\% \pm 3,78\%$   $\alpha_E\beta_7$ -positiver Zellen, während die zusätzliche Stimulation mit IL-15 bei  $18,36\% \pm 4,51\%$  der Zellen die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression induzierte (n=5). In Gegenwart von anti-VLA-4 (n=7) exprimierten  $23,16\% \pm 2,55\%$  das  $\alpha_E\beta_7$ -Antigen. Der prozentuale Anteil  $\alpha_E\beta_7$ -positiver Zellen war in beiden Ansätzen (A: p=0,043; B: p=0,018) signifikant höher als in der Kontrolle. Jedoch hatte weder IL-15 noch VLA-4 einen Einfluß auf die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression der Zellen.

## 5.5 Expression anderer Oberflächenmoleküle im Vergleich zu E 7

### 5.5.1 CD25 (IL-2R)

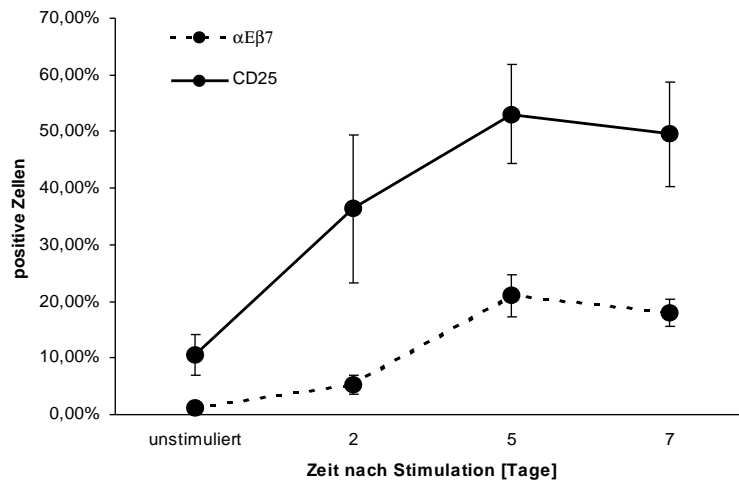
CD25 gilt als Marker der frühen Zellaktivierung. Um Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand  $\alpha_E\beta_7$ -exprimierender Zellen ziehen zu können, wurde daher CD25 durchflußzytometrisch mitbestimmt.



**Abbildung 5.6: Kinetik der CD25-Expression.**  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Isolierung mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 und 10  $\text{ng/ml}$  TGF- $\beta_1$  inkubiert. Zu den Zeitpunkten 2., 5. und 7. Tag nach Stimulation erfolgte die Messung der CD25-Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflußzytometer. Ein Teil der Zellen blieb unstimuliert und diente als Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt ( $n=9$ ). An Tag 2, 5 und 7 erhöhte sich in Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  die CD25-Expression signifikant gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p=0,028$ ). Der Anteil CD25-positiver Zellen lag am 5. ( $p=0,011$ ) und 7. Tag ( $p=0,015$ ) signifikant höher im Vergleich zum Zeitpunkt 0 (unstimuliert).

Die CD25-Expression wurde nach Aktivierung mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  über einen Zeitraum von 7 Tagen gemessen und jeweils mit der Kontrolle aus unstimulierten Zellen verglichen (Abbildung 5.6). Direkt nach Isolierung aus Vollblut und immunomagnetischer Separation waren  $10,77\% \pm 3,15\%$  der  $CD4^+$ -T-Lymphozyten CD25-positiv. Die Kontrollzellen exprimierten während der gesamten Inkubationszeit nur wenig CD25 auf ihrer Oberfläche. Nach einem anfänglichen Rückgang der CD25-Expression an Tag 2, stieg diese im weiteren Verlauf nur mäßig an (maximale Expression am 7. Tag:  $14,95\% \pm 4,19\%$ ). Hingegen nahm die CD25-Expression in Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  im Meßzeitraum kontinuierlich zu und erreichte am 7. Tag ein Maximum von  $51,88\% \pm 8,53\%$  CD25 $^+$ /CD4 $^+$ -T-Zellen. Der Unterschied zwischen aktivierten Zellen und der jeweiligen

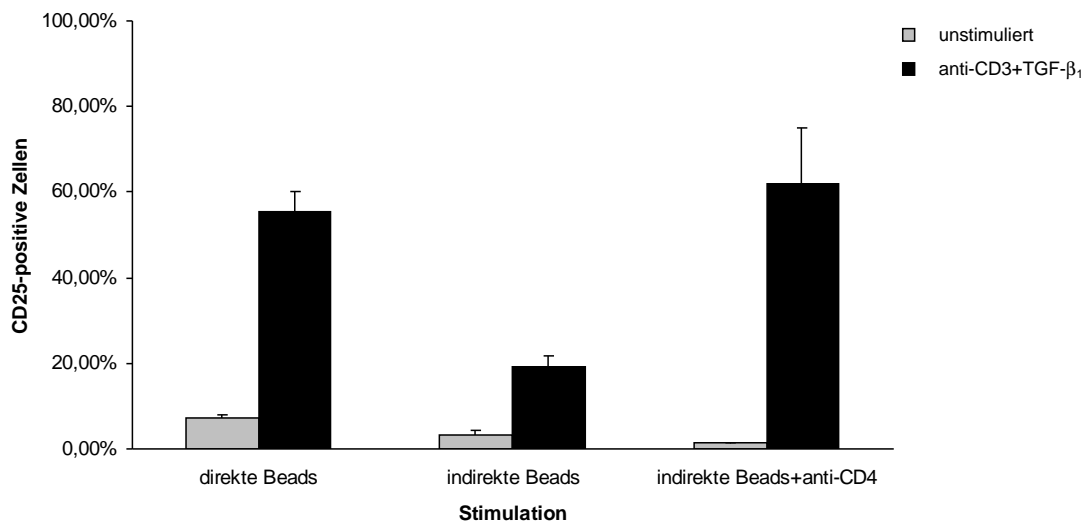
Kontrolle war über den gesamten Zeitraum signifikant ( $p=0,008$ ). Vergleicht man nach Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  die verschiedenen Zeitpunkte miteinander, so zeigte sich erst am 5. ( $p=0,011$ ) und am 7. Tag ( $p=0,015$ ) eine signifikant höhere CD25-Expression gegenüber dem Zeitpunkt 0.



**Abbildung 5.7:** Kinetik der CD25-Expression im Vergleich zu  $\alpha_E\beta_7$ .  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Separation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 und 10 ng/ml TGF- $\beta_1$  inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 (unstimuliert), 2., 5. und 7. Tag nach Stimulation erfolgte die Messung der CD25-Expression sowie der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression an der Zelloberfläche im Durchflußzytometer. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt ( $n=8$ ).

Stellt man das Expressionsverhalten von  $CD4^+$ -T-Lymphozyten bzgl. CD25 und  $\alpha_E\beta_7$  im direkten Vergleich dar (Abbildung 5.7), so verlief die Expression beider Oberflächenmoleküle parallel in der Inkubationsperiode. Die Kontrollzellen exprimierten nur wenig  $\alpha_E\beta_7$ -Antigen ( $1,31\% \pm 0,18\%$ ) auf ihrer Oberfläche. Nach Stimulation stieg der Anteil auf  $5,23\% \pm 1,71\%$  am 2. Tag,  $20,98\% \pm 3,61\%$  am 5. Tag und sank anschließend auf  $18,00\% \pm 2,48\%$  an Tag 7. Der zeitliche Verlauf der CD25-Expression verlief parallel zur  $\alpha_E\beta_7$ -Expression. Der Unterschied lag jedoch im relativ höheren Anteil CD25-positiver Zellen. Unstimuliert zeigten bereits  $10,62\% \pm 3,57\%$  der Zellen CD25 an ihrer Oberfläche. Dieser Anteil stieg von  $36,34\% \pm 13,10\%$  am 2. Tag weiter auf  $53,09\% \pm 8,80\%$  an Tag 5 und sank anschließend am 7. Tag auf  $49,52\% \pm 9,30\%$  CD25-positive Zellen.

Wie oben gezeigt, hatte die Selektionsmethode großen Einfluß auf die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression. Deshalb sollte nachfolgend geklärt werden, ob dieses unterschiedliche Expressionsverhalten auch bei CD25 zu beobachten ist. CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden nach Isolierung aus Vollblut entweder direkt oder indirekt separiert und anschließend mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  für 5 Tage kultiviert. Ein Teil der indirekt gereinigten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erhielt zusätzlich anti-CD4. Am 5. Tag nach Stimulation erfolgte die Messung der CD25-Expression im Durchflußzytometer.

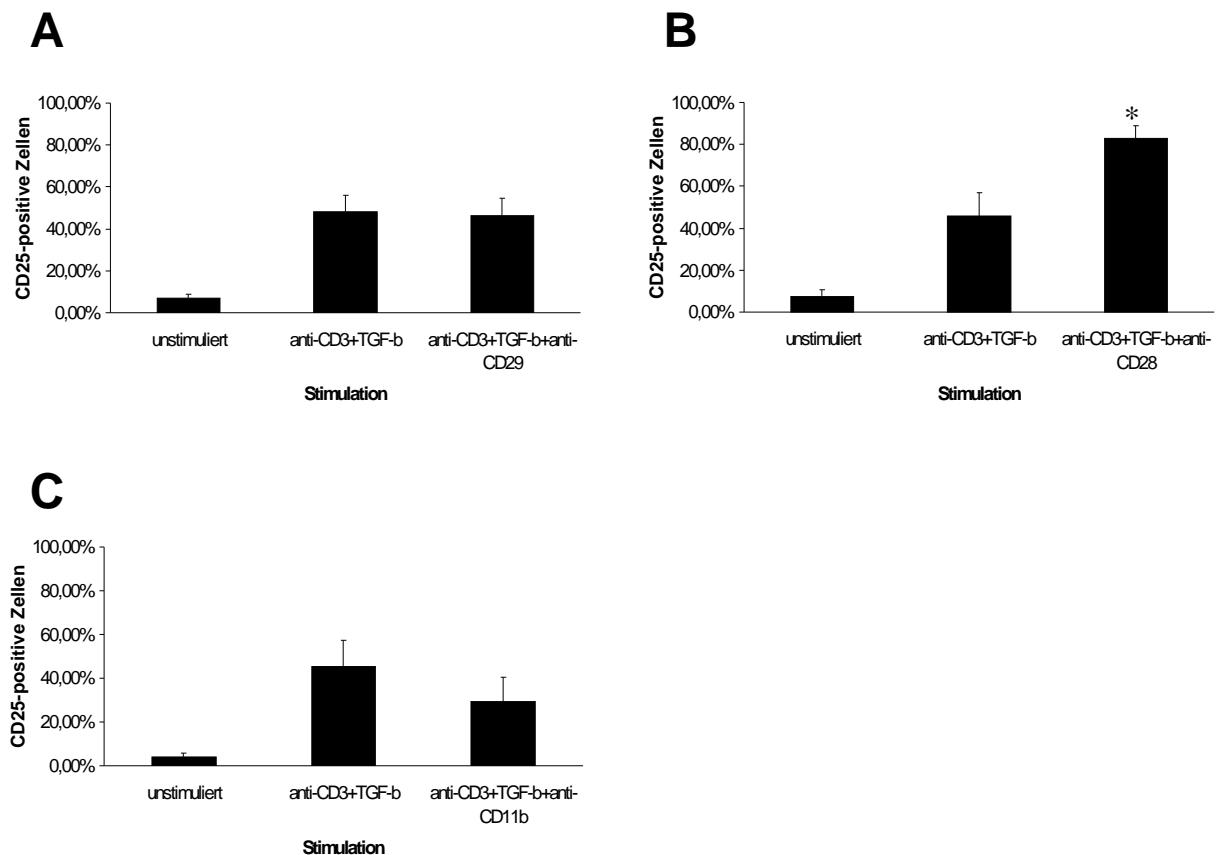


**Abbildung 5.8: Einfluß der Selektionsmethode auf die CD25-Expression.** Nach Isolierung aus Vollblut wurden CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten entweder durch direkte oder indirekte Magnetseparation von den übrigen T-Zellen getrennt und nach Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  für 5 Tage in Kultur genommen. Ein Teil der indirekt separierten Zellen erhielt zusätzlich anti-CD4 (1  $\mu$ g/ml). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt (direkt: n=15; indirekt: n=12; indirekt+anti-CD4: n=6). Unabhängig von der Selektionsmethode erhöhte sich in Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  bei allen Zellen die CD25-Expression signifikant im Vergleich zur Kontrolle (direkt:  $p < 0,001$ ; indirekt:  $p = 0,004$ ; indirekt+anti-CD4:  $p = 0,028$ ). Zwischen direkter und indirekter Separation ergab sich bei aktivierten Zellen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ). Die CD25-Expression war bei indirekter Separation mit anti-CD4 ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zur indirekten Separation ohne zusätzliches anti-CD4 ( $p = 0,003$ ). Hingegen zeigte sich zwischen direkt separierten und indirekt separierten Zellen mit zusätzlicher anti-CD4-Stimulation keine signifikante Änderung in der CD25-Expression.

---

Um die CD25-Expression in Abhängigkeit von der Selektionsmethode darzustellen (Abbildung 5.8), wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit direkter oder indirekter Magnetseparation gereinigt und für 5 Tage mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  inkubiert. Während direkt isolierte Zellen zu 55,54%  $\pm$  4,62% das CD25-Antigen an ihrer Oberfläche zeigten, waren nach indirekter Separation nur 19,18%  $\pm$  2,66% der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten CD25-positiv. Eine zusätzliche Aktivierung von indirekt gereinigten Zellen anti-CD4 induzierte bei 62,00%  $\pm$  13,15% CD25. Unabhängig von der Selektionsmethode ließ sich bei allen stimulierten Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle eine signifikant höhere CD25-Expression nachweisen (direkt:  $p < 0,001$ ; indirekt:  $p = 0,004$ ; indirekt+anti-CD4:  $p = 0,028$ ). Der Vergleich der Selektionsmethoden miteinander zeigte zwischen direkt und indirekt isolierten Zellen ( $p < 0,001$ ), sowie zwischen indirekt und indirekt separierten Zellen mit zusätzlicher anti-CD4-Exposition ( $p = 0,003$ ) einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die CD25-Expression.

In den bisher dargestellten Experimenten zur  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten konnte diese durch Stimulation mit weiteren Antikörpern bzw. Zytokinen nicht signifikant verändert werden. Im Anschluß wurde nun untersucht, ob eine zusätzliche Stimulation mit anti-CD29, anti-CD28 und anti-CD11b auf die CD25-Expression bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Einfluß nimmt.



**Abbildung 5.9:** Einfluß zusätzlicher Stimuli auf die CD25-Expression. CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden nach Isolation mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD3 und 10 ng/ml TGF- $\beta_1$  inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD29 (A), 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 (B) oder 1  $\mu$ g/ml anti-CD11b (C). Am 5. Tag wurde die CD25-Expression im Durchflußzytometer bestimmt. Zur Darstellung kommen die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler CD25-positiver Zellen in Prozent (A: n=8; B: n=5; C: n=5). In allen drei Abbildungen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen. Die Gegenwart von anti-CD29 (A) oder anti-CD11b (C) hatte keinen Einfluß. Anti-CD28 (B) erhöhte signifikant die CD25-Expression im Vergleich zur alleinigen Aktivierung mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  ( $p=0,043$ ).

Die zusätzliche Exposition von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten mit anti-CD29 (Abbildung 5.9A; n=8) oder anti-CD11b (Abbildung 5.9C; n=5) nahm keinen signifikanten Einfluß auf die CD25-Expression. In Gegenwart von anti-CD28 (Abbildung 5.9B; n=5) verdoppelte sich nahezu der Anteil CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (82,87%  $\pm$  6,03%) gegenüber einer alleinigen Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  (45,79%  $\pm$  11,23%). Diese Mehrexpression von CD25 nach zusätzlicher anti-CD28-Aktivierung war sowohl zur Kontrolle ( $p=0,043$ ) als auch zur Positivkontrolle mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  ( $p=0,043$ ) signifikant.

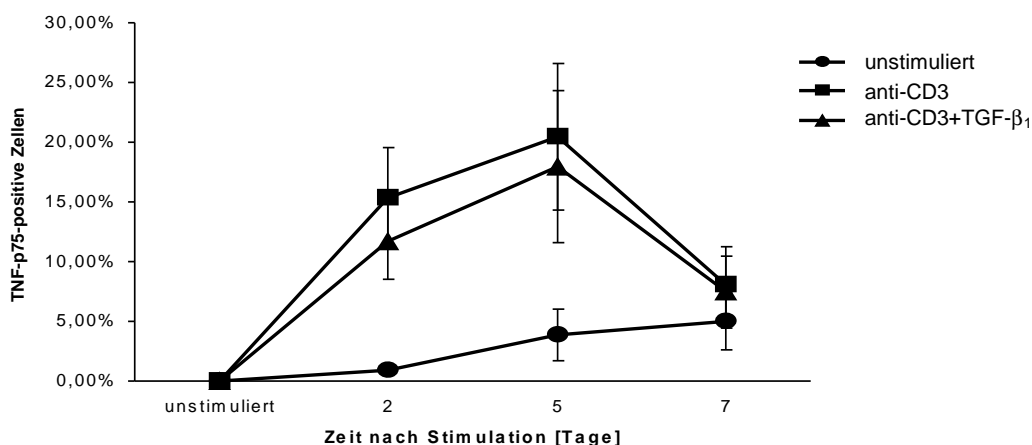


### 5.5.2 TNF-p75 (CD120b)

TNF-p75 findet sich auf einer ganzen Reihe von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen. Als Mitglied der Familie der TNF-Rezeptoren dient TNF-p75 sowohl für TNF- $\alpha$ , wie auch für TNF- $\beta$  als Rezeptor und vermittelt u.a. die Apoptose der Zelle. In der CD-Nomenklatur wird TNF-p75 auch als CD120b geführt.

Neben  $\alpha_E\beta_7$  wurde die Expression von TNF-p75 auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten gemessen, da TNF-p75 als Marker für enddifferenzierte Zellen gilt. So könnten sich Rückschlüsse darauf ziehen lassen, ob es sich bei der  $\alpha_E\beta_7$ -positiven Subpopulation möglicherweise um enddifferenzierte Zellen handelt, die nach der Induktion von  $\alpha_E\beta_7$  vermehrt absterben.

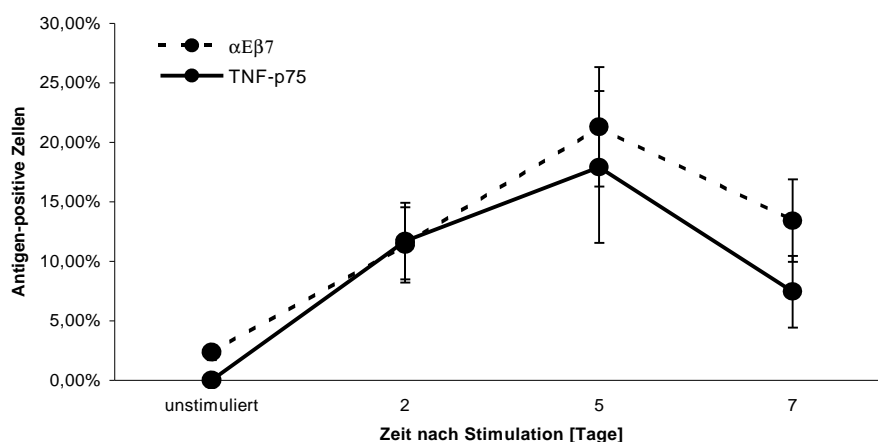
Dazu wurden die  $CD4^+$ -T-Zellen nach Isolation entweder mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  oder nur mit anti-CD3 über 5 Tage stimuliert und anschließend die Expression von TNF-p75 an der Zelloberfläche durchflußzytometrisch bestimmt.



**Abbildung 5.10: Kinetik der TNF-p75-Expression.**  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Isolierung entweder mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 und 10  $\text{ng/ml}$  TGF- $\beta_1$  oder nur mit anti-CD3 inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 (unstimuliert), 2., 5. und 7. Tag erfolgte die Messung der TNF-p75-Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflußzytometer. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt ( $n=5$ ). Einen signifikanten Unterschied zwischen unstimulierten und aktivierten Zellen ergab sich nur am 2. Tag. Die TNF-p75-Expression war im Vergleich zur Kontrolle sowohl nach anti-CD3/TGF- $\beta_1$  als auch nach alleiniger Aktivierung mit anti-CD3 signifikant erhöht ( $p=0,043$ ). Zu allen weiteren Zeitpunkten ließ sich keine signifikante Differenz zu den Kontrollzellen nachweisen. In Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  unterschied sich die TNF-p75-Expression zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nicht. Zellen nach alleiniger anti-CD3-Exposition, exprimierten gegenüber der Kontrolle an Tag 2, 5 wie auch an Tag 7 zu einem signifikant höheren Anteil das TNF-p75-Antigen auf ihrer Oberfläche ( $p=0,043$ ).

Die Expressionskinetik von TNF-p75 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht (Abbildung 5.10; n=5). Direkt nach Separation waren alle CD4<sup>+</sup>-T-Zellen TNF-p75-negativ. Die Kontrollzellen wiesen über 7 Tage hinweg eine kontinuierliche Zunahme der TNF-p75-Expression auf, die jedoch ein Maximum von 5% nicht überschritt. Sowohl die alleinige anti-CD3-, als auch die anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Aktivierung der Zellen induzierte eine ansteigende Expression von TNF-p75 (Maximum am 5.Tag: 20,42%  $\pm$  6,15% bei anti-CD3; 17,93%  $\pm$  6,37% bei anti-CD3/TGF- $\beta_1$ ). Anschließend nahm die Expressionsdichte wieder ab. Eine signifikante Erhöhung des TNF-p75-Antigens auf allen stimulierten Zellen gegenüber der Kontrolle war nur an Tag 2 nachweisbar (p=0,043). Während die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Gegenwart von anti-CD3 zu allen gemessenen Zeitpunkten signifikant mehr TNF-p75 exprimierten als direkt nach der Reinigung (p=0,043), ergab sich nach Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  lediglich am 2. Tag ein signifikanter Unterschied (p=0,043).

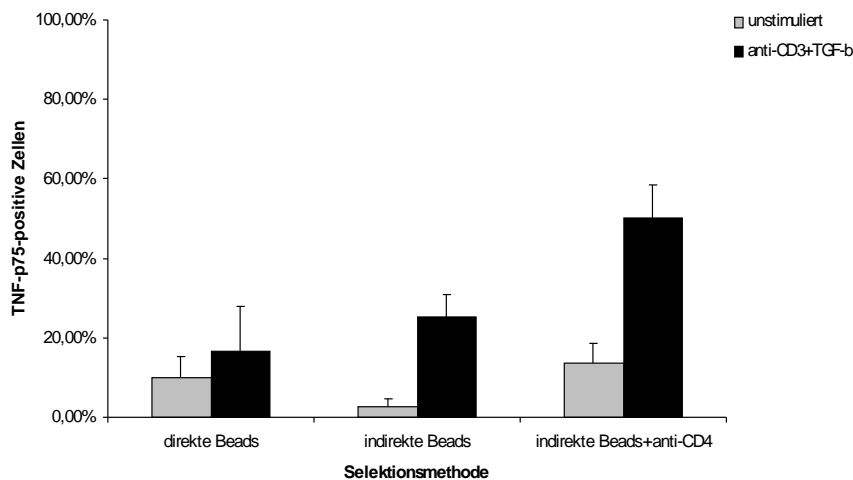
Vergleicht man die Kinetik von TNF-p75 mit der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression, so verhielten sich die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach Stimulation mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$  bzgl. TNF-p75 und  $\alpha_E\beta_7$  ähnlich. Es zeigte sich in der Expression beider Oberflächenmoleküle ein kontinuierlicher Anstieg bis zum 5. Tag nach Stimulation und einem anschließenden Absinken des Anteils positiver Zellen an Tag 7. Abbildung 5.11 gibt diesen Verlauf wieder.



**Abbildung 5.11:** Kinetik der TNF-p75-Expression im Vergleich zu  $\alpha_E\beta_7$ . CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden nach Isolierung mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD3 und 10 ng/ml TGF- $\beta_1$  inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 (unstimuliert), 2., 5. und 7. Tag erfolgte die Messung der TNF-p75-Expression sowie der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression an der Zelloberfläche im Durchflußzytometer. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt (n=5).

In Abbildung 5.11 ist die Kinetik der TNF-p75- und  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten nach Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  dargestellt (n=5). Direkt nach der Separation waren  $2,34\% \pm 0,62\%$  der Zellen  $\alpha_E\beta_7^+$ . TNF-p75 ließ sich zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisen. Eine maximale Expressionsdichte beider Oberflächenmoleküle wurde nach 5 Tagen beobachtet ( $21,29\% \pm 5,02\%$   $\alpha_E\beta_7^+$ -Zellen;  $17,93\% \pm 6,37\%$  TNF-p75 $^+$ ).

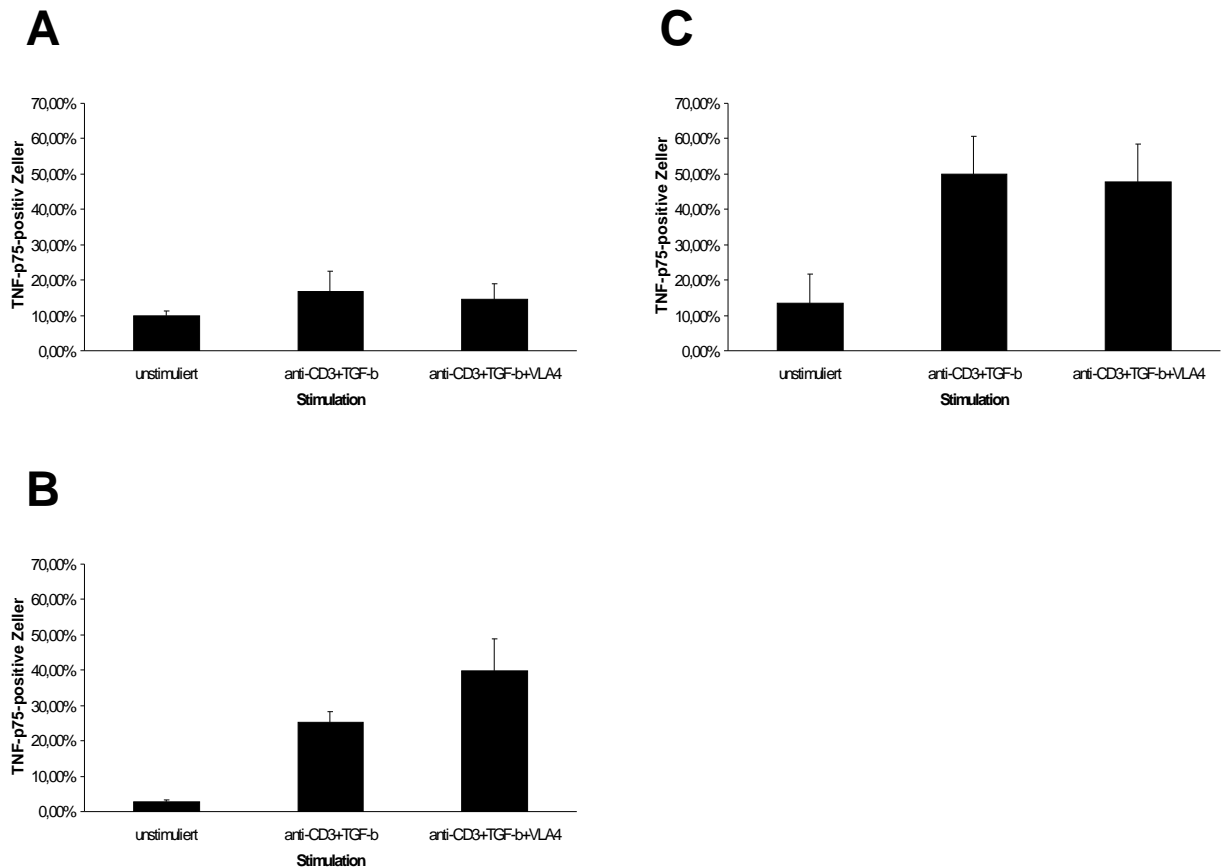
Wie in den vorangegangenen Experimenten sollte nachfolgend untersucht werden, ob die Selektionsmethode auch die TNF-p75-Expression beeinflusst.  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Isolierung aus Vollblut entweder direkt oder indirekt separiert und anschließend in Gegenwart von bzw. ohne anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  (Kontrolle) für 5 Tage kultiviert. Ein Teil der Zellen erhielt zusätzlich anti-CD4. Am 5. Tag erfolgte die Messung der TNF-p75-Expression im Durchflußzytometer.



**Abbildung 5.12: Einfluß der Selektionsmethode auf die TNF-p75-Expression.** Nach Isolierung aus Vollblut wurden  $CD4^+$ -T-Lymphozyten entweder durch direkte oder indirekte Magnetseparation von den übrigen T-Zellen getrennt und mit  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 und  $10 \text{ ng/ml}$  TGF- $\beta_1$  für 5 Tage kultiviert. Ein Teil der indirekt gereinigten Zellen erhielt zusätzlich anti-CD4 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt (direkt: n=7; indirekt: n=7; indirekt+anti-CD4: n=5). Bereits bei den Kontrollzellen ließ sich in Abhängigkeit von der Selektionsmethode ein signifikanter Unterschied in der TNF-p75-Expression beobachten. Dabei exprimierten indirekt isolierte  $CD4^+$ -T-Zellen deutlich weniger TNF-p75 an ihrer Oberfläche als nach direkter ( $p=0,006$ ) oder indirekter Selektion mit zusätzlicher anti-CD4-Aktivierung ( $p=0,028$ ). Bei T-Zellen nach anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Exposition erreichte die indirekte Isolierung mit Zugabe von anti-CD4 die höchste Expressionsrate. Diese Mehrexpression des TNF-p75-Antigens war signifikant gegenüber der direkten Selektion ( $p=0,019$ ).

Die TNF-p75-Expression wurde in Abhängigkeit von der Selektionsmethode untersucht (Abbildung 5.12). Die Kontrollzellen wiesen bereits deutliche Unterschiede auf. So waren indirekt separierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu einem signifikant geringeren Anteil TNF-p75<sup>+</sup>, als Zellen nach direkter (p=0,006) und nach indirekter Reinigung mit Zugabe von anti-CD4 (p=0,028). Bei anti-CD3/TGF-β<sub>1</sub>-stimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erreichte die indirekte Isolierung mit zusätzlicher anti-CD4-Aktivierung die höchste Expressionsrate (50,04% ± 8,36%). Diese Mehrexpression des TNF-p75-Antigens war gegenüber der Oberflächenexpression nach direkter Selektion (16,64% ± 11,12 % TNF-p75<sup>+</sup>-Zellen) signifikant (p=0,019).

Der Einfluß zusätzlicher Stimuli auf die TNF-p75-Expression soll im folgenden am Beispiel von anti-VLA-4 gezeigt werden. Dabei wurde auch die Selektionsmethode mitberücksichtigt (Abbildung 5.13).



**Abbildung 5.13: Einfluß zusätzlicher Stimulation mit VLA-4 auf die TNF-p75-Expression.** Nach Isolierung aus Vollblut wurden  $CD4^+$ -T-Lymphozyten entweder durch direkte (A,  $n=7$ ) oder indirekte (B,  $n=7$ ) Magnetseparation gereinigt und mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  bzw. zusätzlich mit  $1\mu\text{g/ml}$  anti-VLA-4 für 5 Tage in Kultur genommen. Ein Teil der indirekt separierten Zellen erhielt neben der jeweiligen Stimulation noch  $1\mu\text{g/ml}$  anti-CD4 (C,  $n=5$ ). Am 5. Tag erfolgte die Messung der TNF-p75-Expression im Durchflußzytometer. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt. Die Gegenwart von anti-VLA-4 zeigte gegenüber einer alleinigen anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Inkubation keinen statistisch signifikanten Unterschied in der TNF-p75-Expression.

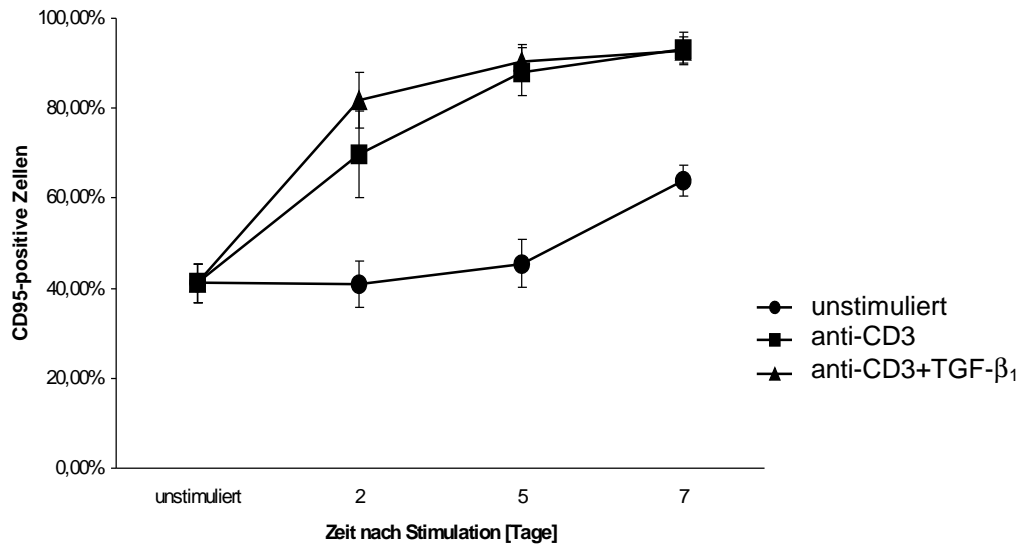
$CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Separation neben anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  zusätzlich mit anti-VLA-4 inkubiert, um eine mögliche Wirkung von anti-VLA-4 auf die TNF-p75-Expression zu untersuchen (Abbildung 5.13). Es zeigte sich, daß indirekt isolierte (5.13B;  $n=7$ ) und indirekt separierte Zellen mit Zugabe von anti-CD4 (5.13C;  $n=5$ ) nach anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Exposition, mit oder ohne Addition von anti-VLA-4, signifikant mehr TNF-p75 exprimierten, als nach direkter Selektion (5.13A;  $n=7$ ). Während, unabhängig von der Stimulation, weniger als 20 % der direkt gereinigten  $CD4^+$ -T-Zellen TNF-p75 $^+$  wurden, nahm die Antigen-Expression nach indirekter Reinigung auf  $25,31\% \pm 2,99\%$ , in Gegenwart von anti-VLA-4 auf  $39,82\% \pm 8,98\%$  zu ( $p=0,018$ ). Die anti-CD4-Aktivierung indirekt separierter

Zellen induzierte in Kombination mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  sogar  $50,04\% \pm 10,56\%$  TNF-p75<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, (mit anti-VLA-4:  $47,70\% \pm 10,85\%$ ). Auch in diesem Fall war die Mehrexpression signifikant gegenüber der Kontrolle ( $p=0,043$ ). Egal mit welcher Methode CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten selektioniert wurden, die Gegenwart von anti-VLA-4 hatte im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  keinen weiteren Einfluß auf die TNF-p75-Expression.

### **5.5.3 CD95 (Fas)**

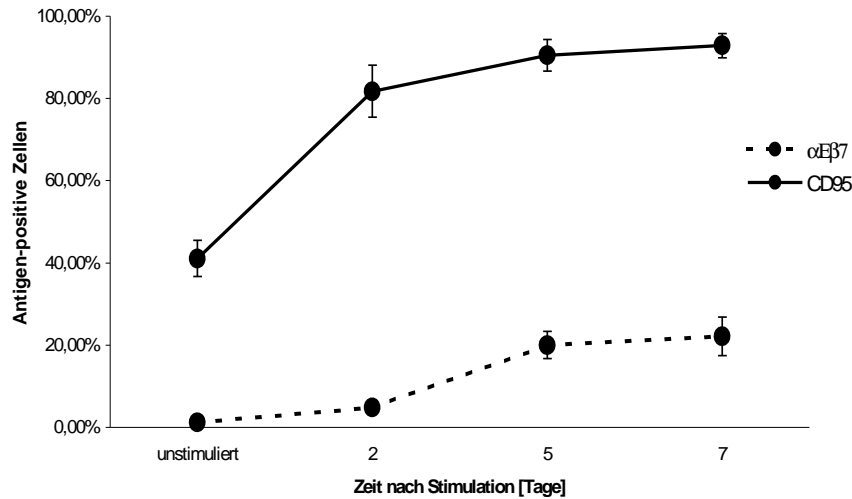
Das Oberflächenmolekül CD95 gehört zur Klasse der TNF-Rezeptoren und findet sich auf unterschiedlichsten Zelllinien, u.a. auch auf aktivierten Lymphozyten. Es dient CD95L (CD178) als Rezeptor und vermittelt über diesen Mechanismus die Apoptose CD95-positiver Zellen. Darüber hinaus ist CD95 an der Regulation des Immunsystems beteiligt.

In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, inwieweit unter den entsprechenden Bedingungen das Expressionsverhalten von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bzgl. CD95 mit dem von  $\alpha_E\beta_7$  korreliert, um die Subpopulation  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten weiter charakterisieren zu können.



**Abbildung 5.14: Kinetik der CD95-Expression.**  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Isolierung mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  oder mit anti-CD3 allein inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 (unstimuliert), 2., 5. und 7. Tag erfolgte die Messung der CD95-Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflußzytometer. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt ( $n=5$ ). Der Unterschied in der CD95-Expressionsrate zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen war, außer direkt nach Separation, während der gesamten Inkubationsperiode signifikant ( $p=0,043$ ). Bereits die alleinige CD3-Aktivierung erhöhte den Anteil  $CD95^+$ -Zellen nahezu in gleichem Maße wie eine anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Exposition.

Abbildung 5.14 gibt die Kinetik der CD95-Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wieder ( $n=5$ ). Bereits direkt nach Separation aus Vollblut zeigten die  $CD4^+$ -Zellen zu  $41,09\% \pm 4,37\%$  CD95 an ihrer Oberfläche. Die Kontrollzellen wiesen erst nach 7 Tagen eine deutliche Zunahme der CD95-Expression auf ( $63,85\% \pm 3,48\%$ ). Hingegen induzierte sowohl die alleinige anti-CD3-Aktivierung wie auch die Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  ab Tag 2 eine signifikante Erhöhung ( $p=0,043$ ) des Anteiles  $CD95^+$ -Zellen auf 93 % (maximalen Expression am 7. Tag). Es ließ sich zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Exposition und der alleinigen Stimulation mit anti-CD3 nachweisen.

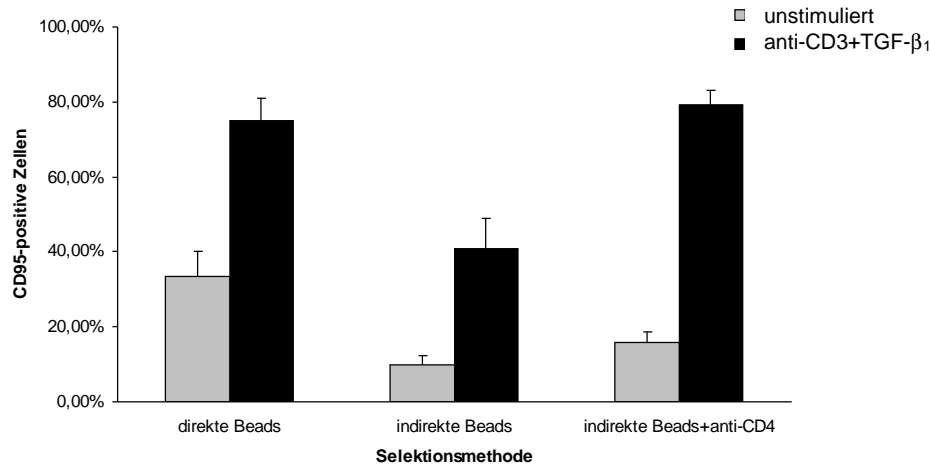


**Abbildung 5.15: Kinetik der CD95-Expression im Vergleich zu  $\alpha_E\beta_7$ .**  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Magnetseparation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  kultiviert. Zu den Zeitpunkten 0 (unstimuliert), 2., 5. und 7. Tag erfolgte die Messung der CD95-Expression sowie der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression an der Zelloberfläche im Durchflußzytometer. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt (n=5).

Das Expressionsmuster von  $CD4^+$ -T-Lymphozyten bzgl. der beiden Oberflächenmoleküle CD95 und  $\alpha_E\beta_7$  in Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  wies in der Kinetik eine ähnliche Tendenz auf (Abbildung 5.15). Direkt nach der Separation waren  $1,24\% \pm 0,18\%$  der Zellen  $\alpha_E\beta_7^+$ , während CD95 sich zu diesem Zeitpunkt bereits auf  $41,09\% \pm 4,37\%$  der Zellen nachweisen ließ. Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm die Expression beider Antigene kontinuierlich zu ( $22,17\% \pm 4,71\%$   $\alpha_E\beta_7^+$ ;  $92,87\% \pm 2,93\%$   $CD95^+$ ).

Um den Einfluß der Selektionsmethode auf die CD95-Expression zu untersuchen, wurden  $CD4^+$ -T-Lymphozyten direkt bzw. indirekt separiert und mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  stimuliert. Die Messung der CD95-Expression an der Zelloberfläche erfolgte durchflußzytometrisch am 5. Tag (Abbildung 5.16).



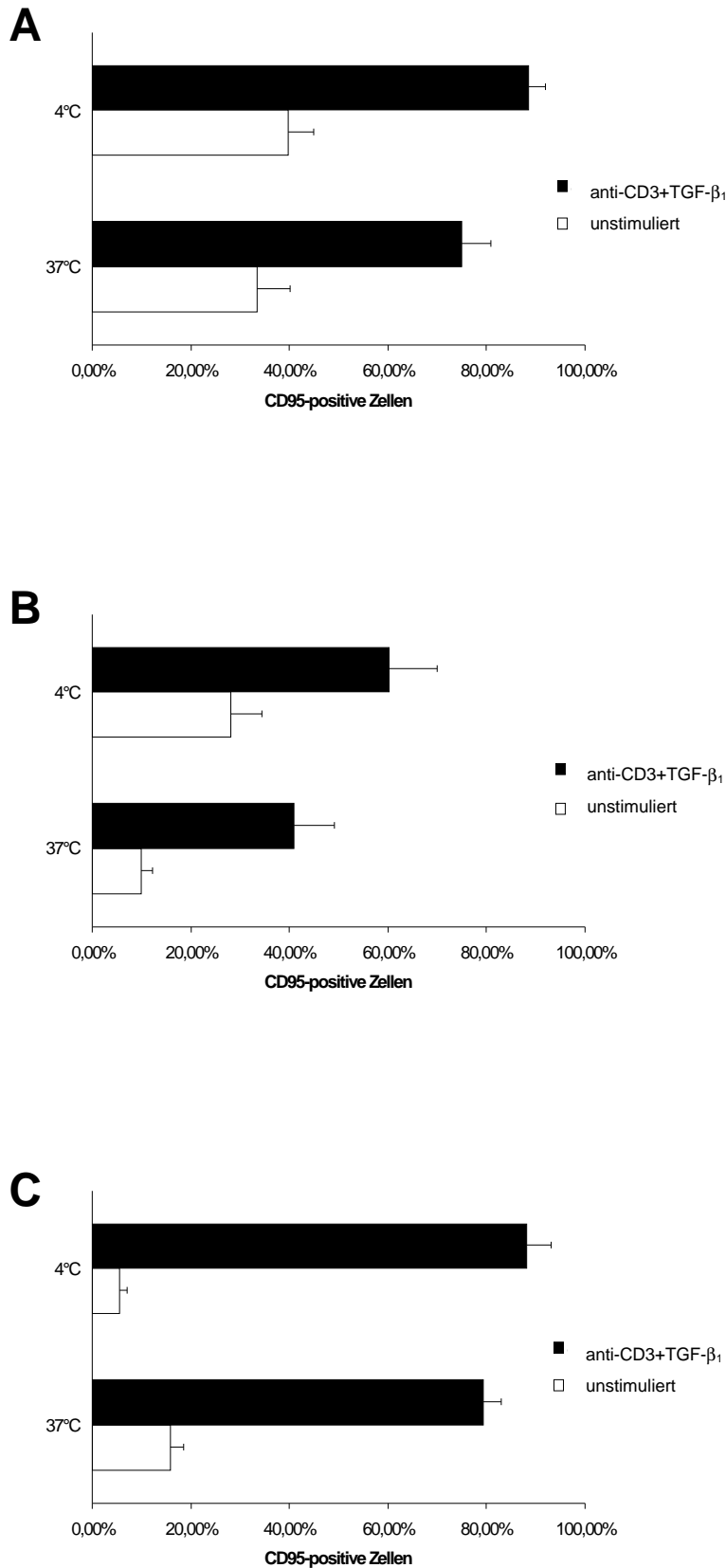


**Abbildung 5.16: Einfluß der Selektionsmethode auf die CD95-Expression.**  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden entweder direkt oder indirekt separiert und mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  für 5 Tage kultiviert. Ein Teil der indirekt isolierten Zellen erhielt zusätzlich anti-CD4 (1 $\mu$ g/ml). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt (direkt: n=6; indirekt: n=6; indirekt+anti-CD4: n=5). Unabhängig von der Selektionsmethode erhöhte sich die CD95-Expression immer nach anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Stimulation signifikant gegenüber der Kontrolle (direkt: p=0,028, indirekt: p=0,028, indirekt+anti-CD4: p=0,043). Der Anteil  $CD95^+$ -T-Zellen nach Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  veränderte sich je nach Art der Separation signifikant. Die niedrigste Expressionsrate zeigte sich nach indirekter Reinigung, während sich bei direkter (p=0,016), sowie indirekter Isolierung mit anti-CD4-Aktivierung (p=0,011) eine deutliche Erhöhung der Antigenexpression beobachten ließ.

Die Dichte der CD95-Expression wies unter unterschiedlichen Selektionsbedingungen eine deutliche Differenz auf (Abbildung 5.16). Nach Exposition mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  wurde, unabhängig von der Separationsmethode, signifikant mehr CD95 auf den  $CD4^+$ -T-Lymphozyten exprimiert als auf den Kontrollzellen. Jedoch spielte für die Höhe des Anteils  $CD95^+/CD4^+$ -Zellen die Art der Reinigung eine erhebliche Rolle. Nach indirekter Reinigung zeigten die mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -inkubierten Zellen zu 40,83%  $\pm$  8,23% CD95 an ihrer Oberfläche. Bei direkt und indirekt isolierten Zellen mit anti-CD4-Aktivierung verdoppelte sich nahezu diese Rate auf 74,99%  $\pm$  5,88% (p=0,016) bzw. auf 79,39%  $\pm$  3,66% (p=0,011). Dabei konnte zwischen direkter und indirekter Separation mit zusätzlicher anti-CD4-Stimulation kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

*In vivo* werden Zellen auch durch die zeitliche Abfolge von Signalen aktiviert. Um zu klären, ob sich die CD95-Expression durch eine sequentielle Aktivierung verändert, wurde im folgenden das Expressionsmuster der Zellen zu unterschiedlichen Vorinkubationstemperaturen (4°C oder 37°C) untersucht. Dabei erfolgte die Zugabe von TGF- $\beta_1$  erst nach einer 30-minütigen Inkubation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit anti-CD3. Die Versuche wurden unter allen drei Selektionsbedingungen durchgeführt (Abbildung 5.17).

Für die CD95-Expression war es unerheblich, ob CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei 4°C oder 37°C vorinkubiert wurden. In diesem Zusammenhang spielte auch die Separationsmethode keine Rolle. Zwar zeigte sich nach direkter Reinigung (Abbildung 5.17A) eine signifikante Erhöhung von CD95<sup>+</sup>-T-Zellen gegenüber indirekt selektierten Zellen (Abbildung 5.17B) und bestätigte die bereits oben aufgeführten Ergebnisse zum Einfluß der Selektionsmethode. Ein signifikanter Unterschied in der Antigenexpression zwischen einer Vorinkubation bei 4°C und 37°C konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die nach indirekter Isolierung zusätzlich mit anti-CD4 vorinkubiert wurden (Abbildung 5.17C) änderte sich an der CD95-Expressiondichte nichts.



#### Abbildung 5.17: Einfluß der sequentiellen Aktivierung auf die CD95-Expression

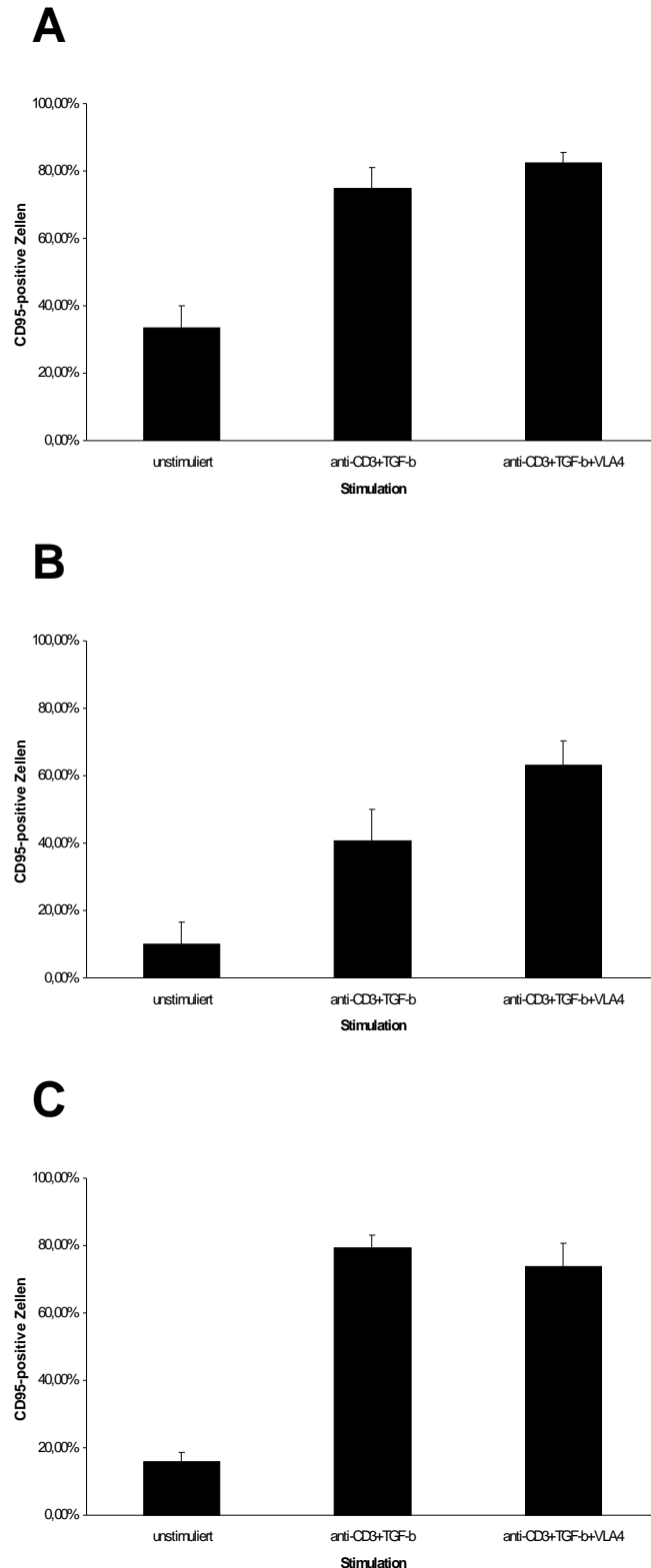
Lymphozyten wurden aus Vollblut isoliert und die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen entweder direkt (A) oder indirekt (B) separiert. Nach Zugabe von anti-CD3 (1 µg/ml) wurden die Zellen für 30 Minuten entweder bei 4°C oder 37°C inkubiert und anschließend einmalig mit Medium gewaschen wurden. Bei indirekt isolierten Zellen mit zusätzlicher anti-CD4-Aktivierung (C), wurde das anti-CD4 (1 µg/ml) gleichzeitig mit anti-CD3 im Rahmen der Vorinkubation zugegeben. Erst danach erfolgte die Stimulation mit TGF $\beta_1$  (10 ng/ml).

Am 5. Tag wurde die CD95-Expression durchflußzytometrisch gemessen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt. A zeigt CD95<sup>+</sup> Zellen nach direkter Separation. Eine Signifikanz zwischen einer Vorinkubation bei 4°C (n=8) gegenüber 37°C (n=6) ergab sich nicht. Auch bei indirekt isolierten Zellen (B; n=8 bei 4°C, n=6 bei 37°C) sowie indirekt gereinigten Zellen mit zusätzlicher anti-CD4-Stimulation (C; n=3 bei 4°C, n=5 bei 37°C) ließ sich zwischen 4°C und 37°C kein signifikanter Unterschied in der CD95-Expression erheben.

Mit  $p=0,012$  bei 4°C vorinkubierten Zellen bzw.  $p=0,016$  bei 37°C zeigte sich bei direkt selektierten Zellen (A) eine signifikant höhere CD95-Expression im Vergleich zu indirekt separierten Zellen (B). Die zusätzliche Stimulation mit anti-CD4 (C) ergab lediglich bei 37°C Vorinkubation eine signifikante Differenz ( $p=0,011$ ) gegenüber indirekt separierten Zellen (B).

Die Gegenwart von anti-VLA-4 erhöhte die Expression des CD25-Antigens, ohne dabei die  $\alpha\beta_7$ - oder die TNF-p75-Expression zu verändern. Abbildung 5.18 zeigt unter verschiedenen Selektionsbedingungen den Einfluß von anti-VLA-4 auf die Expression von CD95.



#### Abbildung 5.18: Einfluß von anti-VLA-4 auf die CD95-Expression

Nach Isolierung aus Vollblut wurden CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten entweder durch direkte (A, n=6) oder indirekte (B, n=6) immunomagnetische Separation von den übrigen T-Zellen getrennt und nach Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  bzw. zusätzlicher Exposition mit anti-VLA-4 für 5 Tage kultiviert. Ein Teil der indirekt gereinigten Zellen erhielt 1  $\mu$ g/ml anti-CD4 (C, n=5). Am 5. Tag erfolgte die Messung der CD95-Expression im Durchflußzytometer. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt. Bei direkt gereinigten Zellen (A) ergab sich zwischen der Kontrolle und den mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$  aktivierten Zellen ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,028$ ). Die Gegenwart von anti-VLA-4 führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der CD95-Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen ( $p=0,028$ ). Verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen erhöhte sowohl bei indirekt (B) als auch bei indirekt separierten Zellen mit anti-CD4-Aktivierung (C) die anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Exposition signifikant den Anteil CD95<sup>+</sup>-Zellen ( $p=0,028$ ). Die Zugabe von anti-VLA-4 induzierte eine signifikante Zunahme der CD95-Expression ( $p=0,043$ ). Zwischen anti-CD3/TGF- $\beta_1$  und zusätzlicher Inkubation mit anti-VLA-4 zeigte sich bei direkter (A;  $p=0,046$ ) und indirekter Reinigung (B;  $p=0,028$ ) ein signifikanter Unterschied. Hingegen ergab bei indirekt isolierten Zellen mit anti-CD4-Stimulation (C) die Gegenwart von anti-VLA-4 gegenüber der alleinigen anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Zugabe keine signifikante Änderung der CD95-Expression.

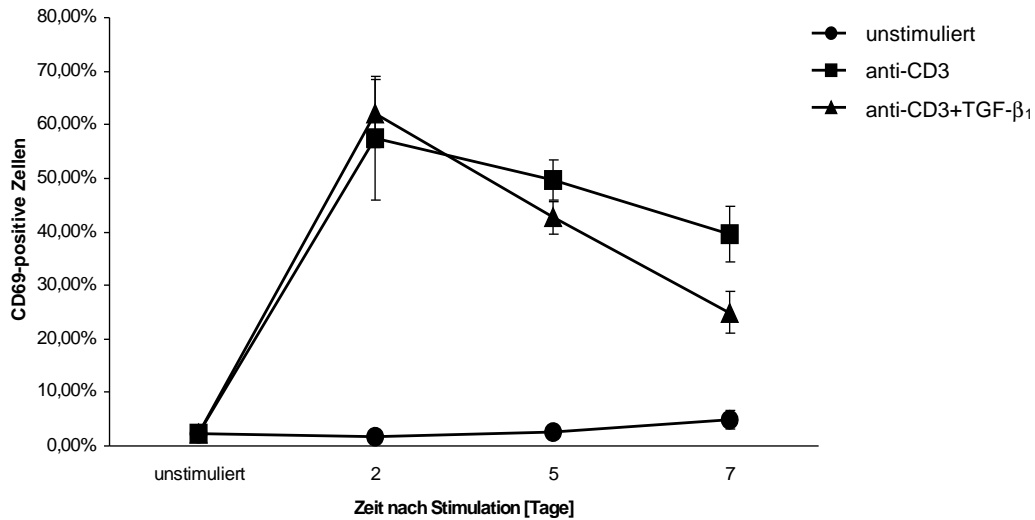
---

Die CD95-Expression wurde in Gegenwart von anti-VLA-4 unter den verschiedenen Selektionsbedingungen untersucht (Abbildung 5.18). Nach direkter (5.18A) und indirekter (5.18B) Reinigung der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erhöhte sich jeweils mit anti-VLA-4 die Antigenexpression signifikant gegenüber der alleinigen Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$ . Während diese Differenz bei direkt isolierten Zellen weniger als 10% betrug (74,99%  $\pm$  5,88%; mit anti-VLA-4: 82,55%  $\pm$  3,01%; p=0,046), nahm der Anteil CD95<sup>+</sup>-T-Zellen nach indirekter Separation und anti-VLA-4-Exposition um 23% auf 63,17%  $\pm$  7,04% zu (p=0,028). Im Vergleich dazu änderte sich die Expressionsdichte von CD95 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die indirekt gereinigt und zusätzlich mit anti-CD4 aktiviert wurden, in Abhängigkeit von der Stimulation mit oder ohne anti-VLA-4 nicht signifikant.

#### 5.5.4 CD69

Bei dem Oberflächenmolekül CD69 handelt es sich um ein C-Typ Lectin. Es findet sich auf aktivierten T- und B-Zellen, sowie aktivierten Makrophagen und NK-Zellen. CD69 zählt zu den frühen Aktivierungsmarkern, darüber hinaus ist jedoch nur wenig über weitere Funktionen bekannt.

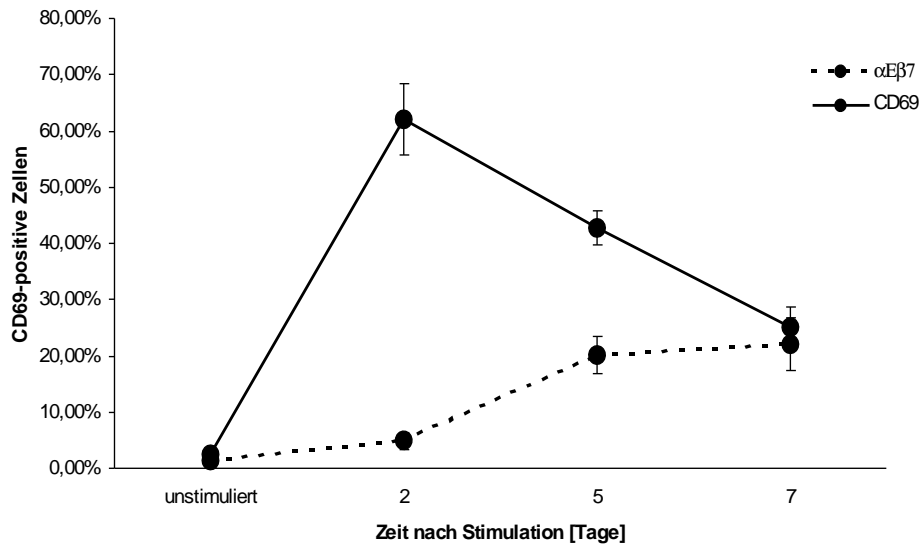
Die Bedeutung von CD69 an der Zelloberfläche der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sollte die übrigen Daten zu CD25 und CD95 ergänzen und eine genauere Bewertung des Aktivierungszustandes von  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ermöglichen.



**Abbildung 5.19: Kinetik der CD69-Expression.**  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Isolierung entweder mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  oder nur mit anti-CD3 inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 (unstimuliert), 2., 5. und 7. Tag erfolgte die Messung der CD69-Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflußzytometer. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt ( $n=5$ ). Während der gesamten Inkubationsperiode war die CD69-Expression im Vergleich zur Kontrolle sowohl nach anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Exposition als auch nach alleiniger Aktivierung mit anti-CD3 signifikant erhöht ( $p=0,043$ ).

Die Expressionsdichte von CD69 auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet ( $n=5$ ; Abbildung 5.19). Direkt nach Separation aus Vollblut zeigten nur  $2,45\% \pm 0,71\%$  aller Zellen CD69 an ihrer Oberfläche. Während der gesamten Inkubationsperiode überschritt der Anteil  $CD69^+$ -T-Zellen in der Kontrolle nie die 5%. Hingegen stieg am 2. Tag die CD69-Expression sowohl nach Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$ , als auch nach alleiniger Aktivierung mit anti-CD3, auf ein Maximum von  $61,98\% \pm 6,33\%$  bzw.  $57,48\% \pm 11,62\%$  an. Anschließend fiel dieser Anteil in beiden Fällen wieder kontinuierlich ab. Dabei nahm die anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -induzierte Expression in stärkerem Maße ab (Tag 5:  $42,70\% \pm 3,05\%$ ; Tag 7:  $24,97\% \pm 3,83\%$ ), verglichen mit der, in Gegenwart von anti-CD3 (Tag 5:  $49,73\% \pm 3,68\%$ ; Tag 7:  $39,63\% \pm 5,16\%$ ). Zu allen Meßzeitpunkten erhöhte die Exposition der  $CD4^+$ -T-Lymphozyten mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$ , wie auch mit anti-CD3 allein, signifikant die Antigenexpression gegenüber den Kontrollzellen ( $p=0,043$ ). Die Differenz zwischen der Aktivierung mit anti-CD3 und der Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  war zu keiner Zeit statistisch signifikant.

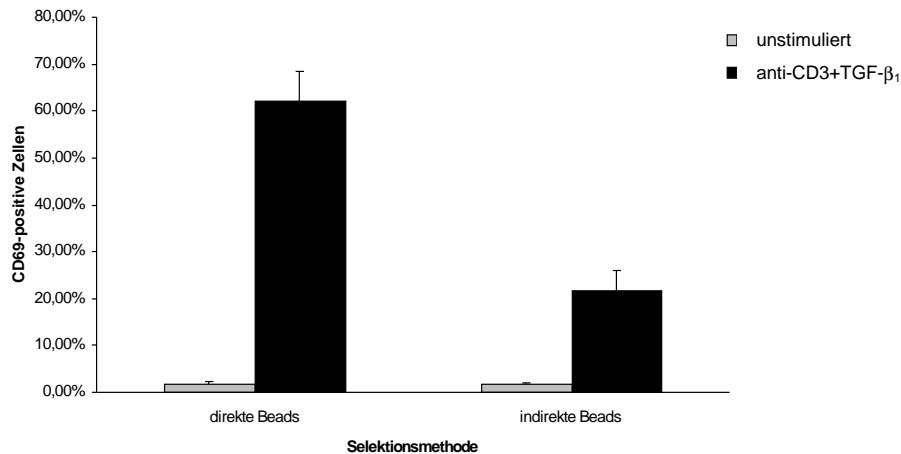
Der direkte Vergleich der CD69-Kinetik mit der Kinetik von  $\alpha_E\beta_7$  zeigte keine Korrelation im Expressionsverhalten der beiden Oberflächenmoleküle (Abbildung 5.20).



**Abbildung 5.20:** Kinetik der CD69-Expression im Vergleich zu  $\alpha_E\beta_7$ .  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden nach Separation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 (unstimuliert), 2., 5. und 7. Tag erfolgte die Messung der CD69- sowie der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression an der Zelloberfläche im Durchflußzytometer. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler in Prozent dargestellt ( $n=5$ ).

Die Kinetik der CD69- und  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten ließ nach Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  deutliche Unterschiede erkennen (Abbildung 5.20). Direkt nach der Isolierung waren  $1,24\% \pm 0,18\%$  der Zellen  $\alpha_E\beta_7^+$ , CD69 zeigte sich zu diesem Zeitpunkt bei  $2,45\% \pm 0,71\%$  der Zellen. Während die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression über den Inkubationszeitraum von 7 Tagen kontinuierlich anstieg (maximale Expression:  $20,03\% \pm 3,32\%$  am 5. Tag), erreichte das CD69-Oberflächenantigen seine maximale Expression bereits am Tag 2 ( $61,98\% \pm 6,33\%$ ) und nahm anschließend wieder ab.

Abschließend sollte der Einfluß der Selektionsmethode auf die Expression von CD69 untersucht. Hierzu wurden  $CD4^+$ -T-Lymphozyten direkt bzw. indirekt gereinigt und mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  stimuliert. Die Messung der CD69-Expression an der Zelloberfläche erfolgte durchflußzytometrisch direkt an Tag 0, 2, 5 und 7 (Abbildung 4.21).



**Abbildung 5.21: CD69-Expression unter Einfluß der Selektionsmethode.** Nach Isolierung aus Vollblut wurden CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten entweder durch direkte oder indirekte Magnetseparation von den übrigen T-Zellen getrennt und nach Stimulation mit anti-CD3 und TGF-β<sub>1</sub> für insgesamt 7 Tage kultiviert. Gezeigt werden die Messungen vom 2. Tag. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler in Prozent dargestellt (direkt: n=5; indirekt: n=5). Unabhängig von der Selektionsmethode erhöhte sich die CD69-Expression immer nach Inkubation mit anti-CD3 und TGF-β<sub>1</sub> signifikant gegenüber der Kontrolle (direkt: p=0,043, indirekt: p=0,043). Der Vergleich der beiden Selektionsmethoden zeigte lediglich am 2. Tag einen signifikanten Unterschied (p=0,009). Zu allen anderen Zeitpunkten ergab sich keine Signifikanz (Daten nicht abgebildet).

Abbildung 5.21 gibt die CD69-Expression 2 Tage nach Stimulation mit anti-CD3 und TGF-β<sub>1</sub> in Abhängigkeit der Selektionsmethode wieder. Direkt isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen exprimierten das CD69-Antigen zu 61,98% ± 6,33% auf ihrer Oberfläche, im Vergleich zu 1,78% ± 0,39% positiver Zellen in der Kontrolle (p=0,043). 21,74% ± 4,22% der indirekt separierten Zellen waren nach anti-CD3/TGF-β<sub>1</sub>-Exposition CD69<sup>+</sup>. Der Anteil CD69<sup>+</sup>-T-Zellen lag in der Kontrolle bei 1,81% ± 0,27% (p=0,043). Nur am 2. Tag zeigte die CD69-Expression von direkt und indirekt separierten Zellen einen signifikanten Unterschied (p=0,009).



## 5.6 Zytokin-Genexpression in CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Bei der Messung der Oberflächenexpression von  $\alpha_E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zeigten sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Selektionsmethode. Es wurde nun überprüft, inwieweit sich direkt und indirekt separierte Zellen auf RNA-Ebene im Hinblick auf die Expression verschiedener Zytokine unterscheiden.

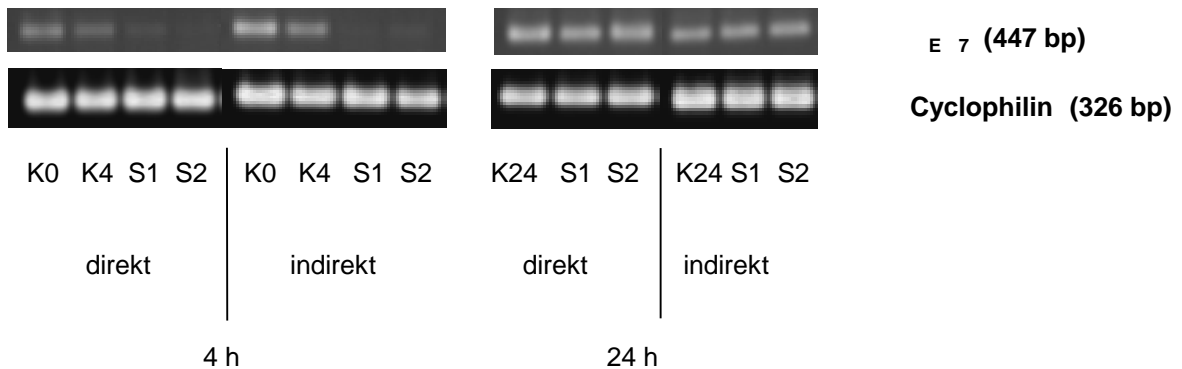
### 5.6.1 $\alpha_E\beta_7$ -mRNA-Expression in CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Für einen PCR-Ansatz wurden jeweils  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unmittelbar nach direkter als auch indirekter Separation für 4 Stunden bzw. 24 Stunden entweder mit anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) und TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) oder mit anti-CD3 allein kultiviert. Nach Isolierung der RNA erfolgte eine Umschreibung mit Oligoprimern in cDNA. Anschließend wurde eine RT-PCR mit  $\alpha_E\beta_7$ -spezifischen Primern durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Belichtung nachgewiesen. Zur Gewährleistung gleicher mRNA-Mengen lief parallel die RT-PCR von Cyclophilin, als ein in allen Zellen etwa gleich stark exprimiertes Haushaltsgen.

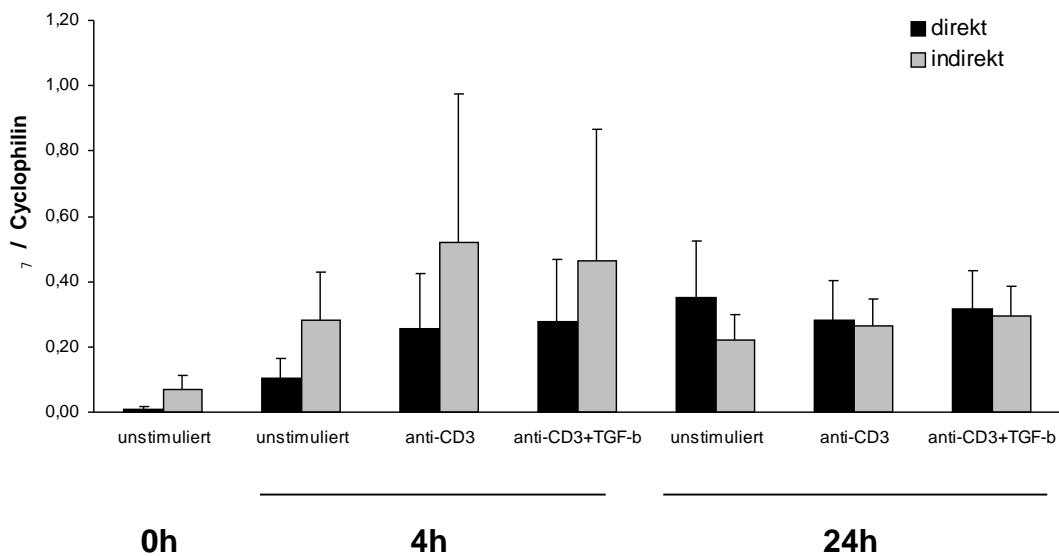
Es wurden sechs voneinander unabhängige Ansätze durchgeführt (Abbildung 5.22). Direkt nach Separation (unstimuliert, 0h) exprimierten unstimulierte Zellen, unabhängig von der Selektionsmethode, kaum  $\alpha_E\beta_7$ -mRNA (direkt:  $0,01 \pm 0,01$ ; indirekt:  $0,07 \pm 0,04$ ). Nach 4 Stunden zeigte sich in den Kontrollzellen eine Mehrexpression, wobei in indirekt gereinigten Zellen ( $0,28 \pm 0,15$ ) deutlich mehr  $\alpha_E\beta_7$ -mRNA nachweisbar war, als in direkt isolierten ( $0,10 \pm 0,06$ ). Dieses Verhältnis kehrte sich nach 24 Stunden um. So erhöhte sich bei direkt separierten Zellen die mRNA-Expression von  $\alpha_E\beta_7$  auf  $0,35 \pm 0,17$ . Nach indirekter Isolierung verringerte sich die Expression in unstimulierten Zellen auf  $0,22 \pm 0,08$ . Die Stimulation mit anti-CD3 führte nach 4 Stunden zu einer deutlichen Mehrexpression von  $\alpha_E\beta_7$ -mRNA im Vergleich zur Kontrolle. Indirekt separierte Zellen zeigten wiederum eine höhere Expression ( $0,52 \pm 0,46$ ) als Zellen nach direkter Reinigung ( $0,26 \pm 0,17$ ). Die Stimulation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  änderte das Genexpressionsmuster, verglichen mit alleiniger anti-CD3-Inkubation nur wenig (direkt:  $0,28 \pm 0,19$ ; indirekt:  $0,46 \pm 0,40$ ). Nach 24 Stunden zeigte sich in anti-CD3-aktivierten, direkt gereinigten Zellen kein nennenswerter Unterschied im Hinblick auf die  $\alpha_E\beta_7$ -mRNA-Expression ( $0,28 \pm 0,12$ ). Auch die Kombination von anti-CD3 mit TGF- $\beta_1$  führte zu keiner Änderung der Antigenexpression innerhalb von 4 und 24

Stunden ( $0,32 \pm 0,12$ ). In indirekt separierten Zellen hingegen verringerte sich nach 24 Stunden die Expression von  $\alpha_E\beta_7$  deutlich, sowohl in Gegenwart von anti-CD3 ( $0,26 \pm 0,08$ ) als auch nach Exposition mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  ( $0,32 \pm 0,09$ ). Dadurch wurde der Unterschied zwischen beiden Isolierungsmethoden aufgehoben.

## A



## B



**Abbildung 5.22: Cyclophilin- und  $E_7$ -mRNA-Expression  $CD4^+$ -T-Lymphozyten.** Direkt und indirekt separierte  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden für 4 bzw. 24 Stunden mit anti-CD3 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) allein oder mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  ( $10 \text{ ng/ml}$ ) inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und davon eine RT-PCR zum Nachweis der Cyclophilin- bzw.  $E_7$ -spezifischen mRNA durchgeführt. Es folgte die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Proben und deren Darstellung unter UV-Belichtung. B zeigt die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=6$ ). Dabei wurde die  $E_7$ -mRNA-Expression zu der von Cyclophilin in Beziehung gesetzt und der Quotient daraus errechnet. In A ist ein repräsentatives Gel aus sechs, voneinander unabhängigen Ansätzen dargestellt. Die Kontrollzellen sind je nach Zeitpunkt mit K0 (unstimuliert, 0h), K4 (unstimuliert, 4h) und K24 (unstimuliert, 24h) beschriftet. Die stimulierten Zellen sind in S1 (anti-CD3) und S2 (anti-CD3+TGF- $\beta_1$ ) aufgeteilt.

### 5.6.2 Unterschiede in der mRNA-Expression in CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Abhängigkeit von Stimulation und Selektionsmethode

Neben Unterschieden in der mRNA-Expression von  $\alpha_E\beta_7$  sollte analysiert werden, inwieweit andere Gene in Abhängigkeit von der Art der Stimulation und der Selektionsmethode exprimiert werden.

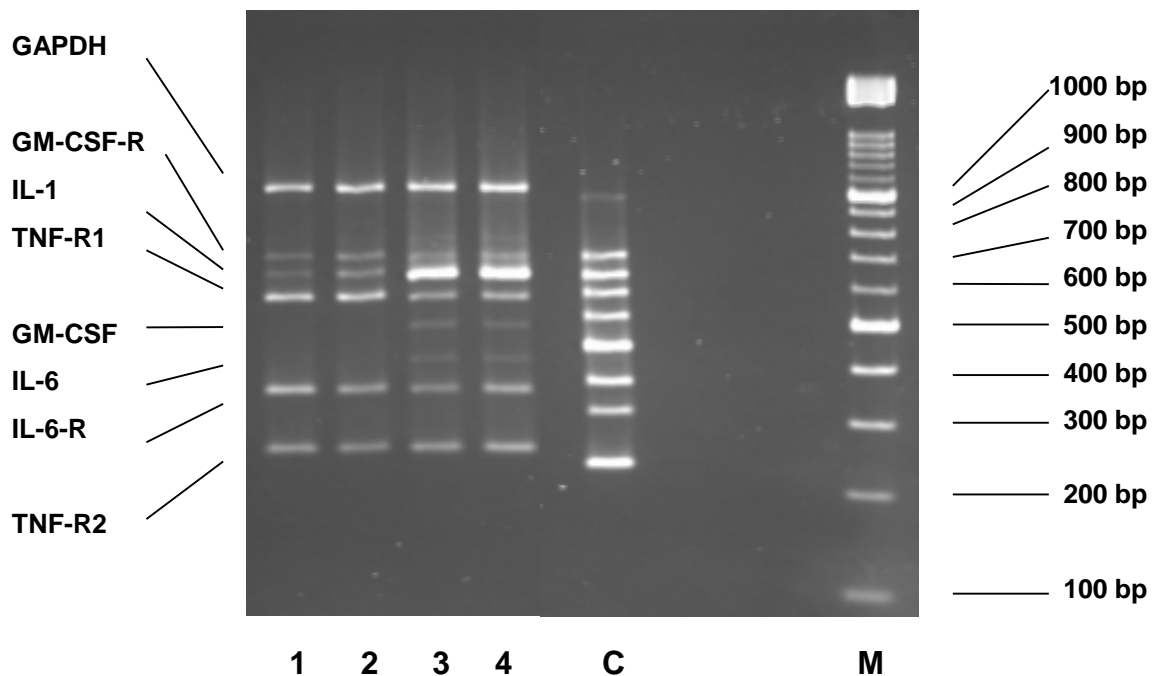
Um bei diesem Vergleich mehrere Gene gleichzeitig untersuchen zu können, die im Kontext zur lokalen wie auch zur systemischen Entzündungsreaktion stehen, wurde hierfür das Human Inflammatory Gene Set 3 (BioSource International, Camarillo, CA, USA) verwendet. Diese Multiplex PCR (MPCR) ermöglichte den Nachweis der Expression von neun Genen gleichzeitig (TNF- $\alpha$ , TNF-R1, TNF-R2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-6-R, GM-CSF, GM-CSF-R, GAPDH). Durch den Einsatz mehrerer, aufeinander abgestimmter Primerpaare und einem optimierten MPCR-Puffer konnte die simultane Amplifikation unterschiedlicher DNA-Sequenzen in einem Reaktionsschritt erfolgen.

CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden sofort nach direkter (Abbildung 5.23) bzw. indirekter (Abbildung 4.24) Separation für 24 Stunden mit anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) und TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) oder mit anti-CD3 allein inkubiert. Unstimulierte Zellen dienten jeweils als Kontrolle. Nach RNA-Isolierung und Umschreibung in cDNA folgte die MPCR. GAPDH wurde als ein in allen Zellen gleichstark exprimiertes Haushaltsgen eingesetzt.

In Abbildung 5.23 ist das MPCR-Gel nach direkter Separation dargestellt. Zwischen den beiden Kontrollgruppen unstimulierter Zellen unmittelbar nach Separation (Spur 1) und nach 4 Stunden (Spur 2) zeigte das Expressionsmuster keinen Unterschied. Beide Kontrollen exprimierten deutlich die mRNA für TNF-R2, TNF-R1 und IL-6-R. Eine mRNA-Expression von GM-CSF-R und IL-1 $\beta$  war dagegen nachweisbar, fiel im Vergleich zur Intensität der anderen Banden jedoch geringer aus. TNF- $\alpha$ , GM-CSF und IL-6 wurden von unstimulierten Zellen nicht exprimiert.

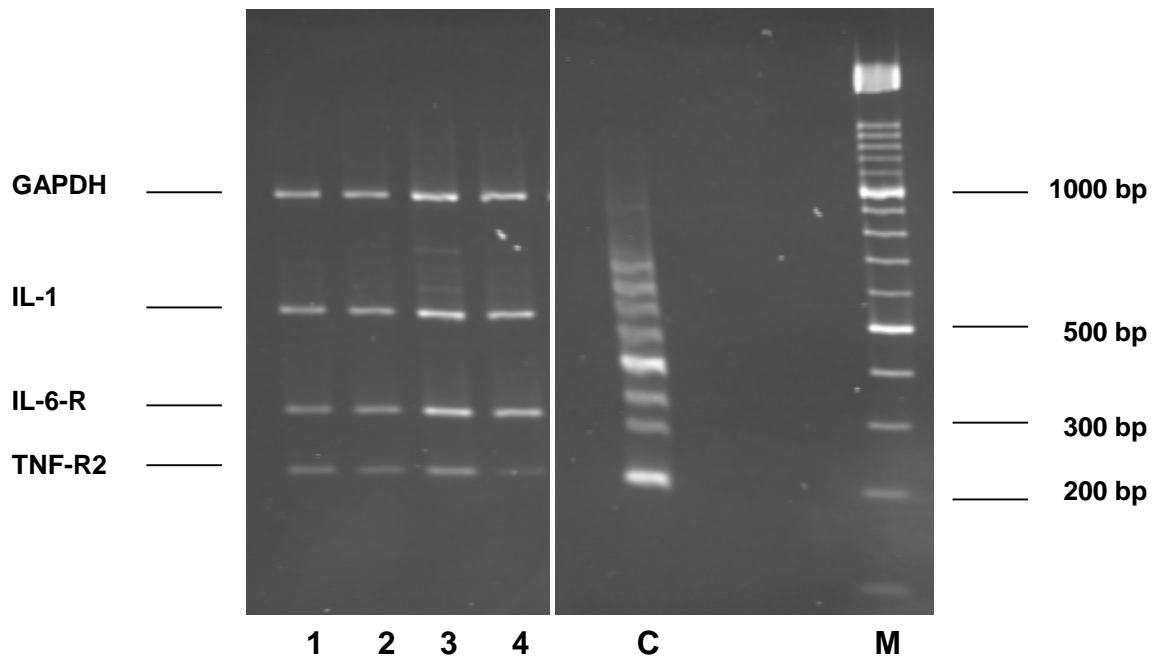
In Gegenwart von anti-CD3 (Spur 3) wie auch von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  (Spur 4) konnte eine deutliche Mehrexpression der IL-1 $\beta$ -mRNA gegenüber der Grundexpression in Kontrollzellen nachgewiesen werden. Dabei fiel die Mehrexpression nach anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  geringer aus als mit anti-CD3 alleine. Die IL-6-R-mRNA wurde ebenfalls durch beide Stimulationen zusätzlich induziert, wobei sich wiederum in anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -aktivierten Zellen die Expression von IL-6-R-mRNA in geringerem Maße erhöhte als mit anti-CD3.

Während sich Kontrollzellen in der Expression von TNF-R2-mRNA kaum von den stimulierten Zellen unterschieden, verringerte sich die TNF-R1-mRNA-Expression nach alleiniger anti-CD3-Inkubation. Die anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Exposition verminderte die Expression von TNF-R1 noch deutlicher. Auch die mRNA-Expression von GM-CSF-R war nach anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  verringert. Anti-CD3 allein hatte dagegen keinen nennenswerten Einfluß. Im Gegensatz zu unstimulierten Zellen wiesen beide Gruppen aktivierter Zellen eine basale Expression von GM-CSF- und IL-6-mRNA auf. Die mRNA von TNF- $\alpha$  war auch in stimulierten Zellen nicht nachweisbar.



**Abbildung 5.23:** Multiplex PCR zum mRNA-Nachweis inflammatorischer Zytokine in direkt separierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus mehreren, voneinander unabhängigen Ansätzen ( $n=5$ ) einer Multiplex PCR von direkt separierten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Die Zellen wurden nach Reinigung 24 Stunden lang mit anti-CD3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) allein (Spur 3) oder mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) inkubiert (Spur 4). Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen direkt nach Isolierung (Spur 1) und nach 24 Stunden (Spur 2). Der Marker weist die Banden in 100 bp-Schritten auf (Spur M). Die Positivkontrolle (Spur C) zeigt die erwarteten Banden der Genprodukte von Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, 921 bp), Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF- $\alpha$ , 680 bp), "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor" Rezeptor (GM-CSF-R, 607 bp), Interleukin-1 (IL-1, 555 bp), Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1 (TNF-R1, 490 bp), "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF, 424 bp), Interleukin-6 (IL-6, 360 bp), Interleukin-6 Rezeptor (IL-6-R, 300 bp) und Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 2 (TNF-R2, 220 bp).

Im folgenden wurde dieses Expressionsverhalten unter gleichen Bedingungen mit dem indirekt separierter Zellen verglichen.



**Abbildung 5.24: Multiplex PCR zum mRNA-Nachweis inflammatorischer Zytokine in indirekt separierten Zellen.** Abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus mehreren, voneinander unabhängigen Ansätzen ( $n=4$ ) einer Multiplex PCR von indirekt separierten  $CD4^+$ -T-Lymphozyten. Die Zellen wurden nach Isolierung 24 Stunden lang mit anti-CD3 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) allein (Spur 3) oder mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  ( $10 \text{ ng/ml}$ ) inkubiert (Spur 4). Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen direkt nach Reinigung (Spur 1) und nach 24 Stunden (Spur 2). Der Marker weist die Banden in 100 bp-Schritten auf (Spur M). Die Positivkontrolle (Spur C) zeigt die erwarteten Banden der Genprodukte der MPCR.

Vergleicht man das Expressionsmuster von direkt (Abbildung 5.23) und indirekt separierten Zellen (Abbildung 5.24), so wird deutlich, daß mehrere Gene von indirekt isolierten Zellen nicht exprimiert werden.

Nach indirekter Reinigung (Abbildung 5.24) verfügten unstimulierte Zellen beider Kontrollen (Spur 1: 0h, Spur 2: 24h) über eine etwa vergleichbare mRNA-Expression von TNF-R2, IL-6-R und IL-1 $\beta$ . Während die übrigen Zielgene nicht nachweisbar sind. Die Inkubation mit anti-CD3 (Spur 3) erhöhte im Vergleich zu den Kontrollen die mRNA-Expression der drei Gene nur geringfügig. In anti-CD3-stimulierten Zellen konnte zusätzlich eine niedrige Expression von TNF- $\alpha$ - und GM-CSF-R-mRNA nachgewiesen werden. In Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  (Spur 4) zeigten die Zellen ein, mit dem der Kontrolle vergleichbares Expressionsmuster, mit Expression von TNF-R2-, IL-6-R- und IL-1 $\beta$ -mRNA.

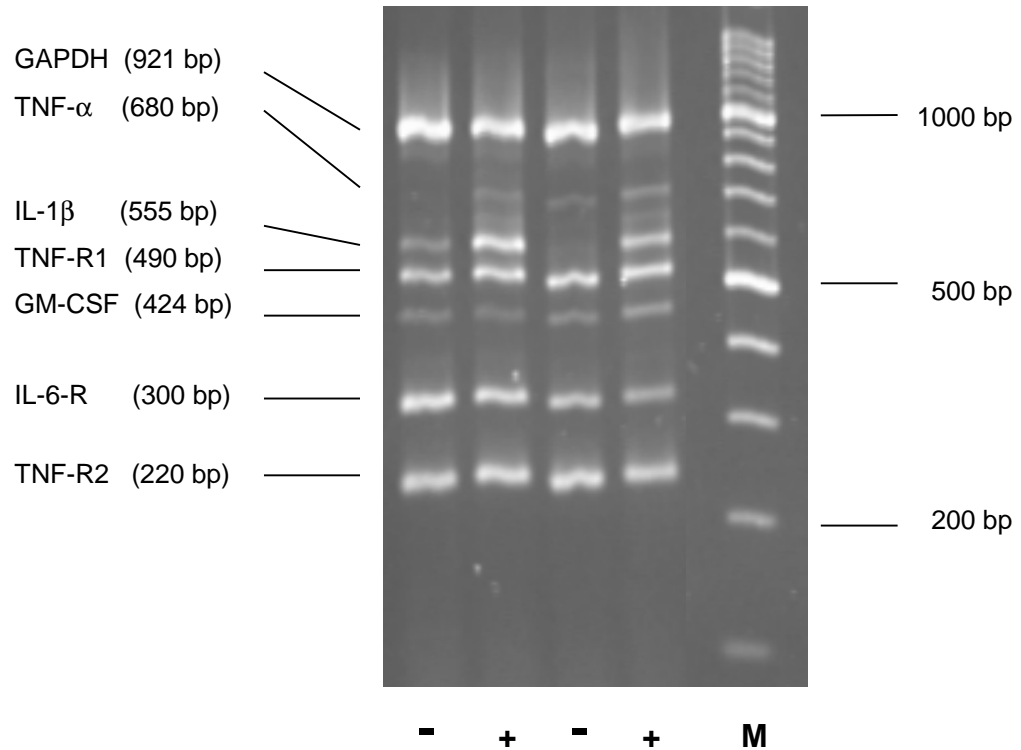
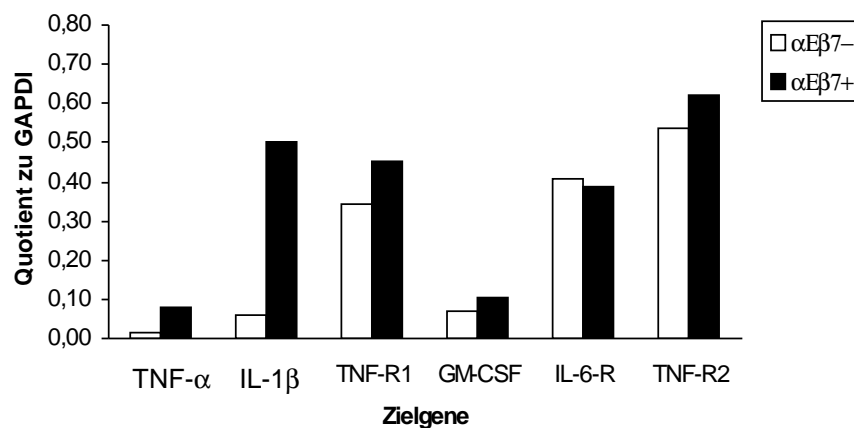
Während sich in der Expression von IL-6-R- und IL-1 $\beta$ -mRNA kein nennenswerter Unterschied zwischen den vier Banden zeigte, war die TNF-R2-mRNA-Expression nach Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  deutlich geringer als in den Kontrollzellen und nach alleiniger anti-CD3-Stimulation.

### 5.6.3 Unterschiedliche mRNA-Expression in $E_{\gamma}^{+/-}$ und $E_{\gamma}^{-}/CD4^{+}$ -T-Lymphozyten

In den vorangegangenen Experimenten wies die Genexpression in  $CD4^{+}$ -T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Selektionsmethode Unterschiede auf. Die nachfolgend dargestellten Versuche analysierten direkt die  $\alpha_E\beta_7^{+}$ - und  $\alpha_E\beta_7^{-}$ -Subpopulationen von  $CD4^{+}$ -T-Lymphozyten, um zu klären, ob eine unterschiedliche mRNA-Expression hier ebenfalls nachweisbar ist und, ob sich parallele Tendenzen zu den bisherigen PCR-Ergebnissen finden lassen.

$CD4^{+}$ -T-Lymphozyten wurden nach direkter Separation für 7 Tage mit anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) und TGF- $\beta_1$  (10 ng/ml) kultiviert. Am 7. Tag nach Stimulation erfolgte zunächst die Ficoll-Separation zur Eliminierung nicht-viabler Zellen. Anschließend wurden die viablen Zellen mittels Magnetseparation in  $\alpha_E\beta_7^{+}$ - und  $\alpha_E\beta_7^{-}$ -Zellen aufgetrennt und nochmals für 4 Stunden bei 4° C mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  inkubiert. Nach RNA-Isolierung und Umschreibung in cDNA folgte die MPCR wie oben beschrieben.

In beiden Ansätzen zeigte sich in der mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  der deutlichste Unterschied zwischen den Subpopulationen (Abbildung 5.25).  $\alpha_E\beta_7^{+}/CD4^{+}$ -T-Lymphozyten exprimierten IL-1 $\beta$ -mRNA deutlicher als  $\alpha_E\beta_7^{-}$ -Zellen, in denen nur eine Spur von IL-1 $\beta$ -mRNA nachweisbar war. Im Hinblick auf die Expression der mRNA für TNF-R1, TNF-R2 und IL-6-R unterschieden sich die beiden Subpopulationen nicht wesentlich voneinander. Die mRNA von TNF- $\alpha$  und GM-CSF ließ sich bei beiden Gruppen nur in geringer Menge nachweisen. IL-6- und GM-CSF-R-mRNA konnte weder in  $\alpha_E\beta_7^{+/-}$  noch in  $\alpha_E\beta_7^{-}/CD4^{+}$ -T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

**A****B**

**Abbildung 5.25: Multiplex PCR von  $E 7^+/-$  und  $E 7^-/CD4^+$ -T-Lymphozyten.** Abgebildet ist ein repräsentatives Gel zweier voneinander unabhängiger Ansätze einer Multiplex PCR von  $E 7^+$  (Spur +) und  $E 7^-$  (Spur -)  $CD4^+$ -T-Lymphozyten (A). Die  $CD4^+$ -Zellen wurden nach direkter Separation für 7 Tage mit anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) und TGF- $\gamma$  (10 ng/ml) kultiviert. Anschließend erfolgte mittels Magnetseparation die Auftrennung in  $E 7^+$  und  $E 7^-$  Zellen. Beide Subpopulationen wurden nochmals für 4 Stunden mit anti-CD3 und TGF- $\gamma$  bei 4° C inkubiert, bevor die RNA-Isolierung, die Umschreibung in cDNA und schließlich die MPCR durchgeführt wurden. Der Marker weist die Banden in 100 bp-Schritten auf (Spur M). Nach Auswertung beider PCR-Gele wurde aus den für jedes Gen errechneten Quotienten (Zielgen  $\div$  GAPDH) der Mittelwert bestimmt und als Balkendiagramm dargestellt (B).

## 6 Diskussion

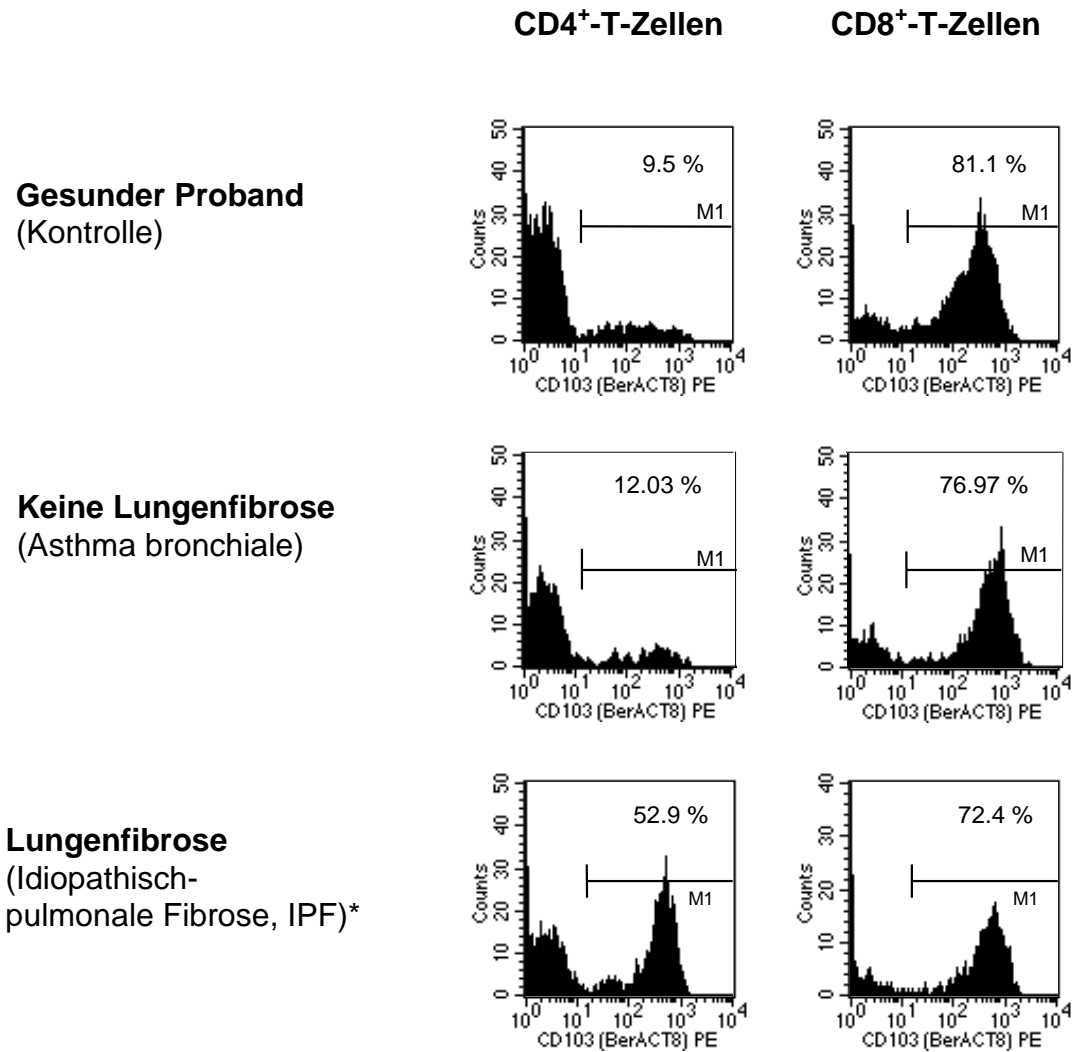
### 6.1 Bronchiale $\alpha_E\beta_7^+$ -T-Lymphozyten bei Lungenfibrosen

Für die Interaktion zwischen IEL und Epithelzellen spielen Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Integrine eine wichtige Rolle. Diese Moleküle vermitteln nach heutigem Verständnis Zelladhäsion und -erkennung in einer Vielzahl von Prozessen, einschließlich Embryogenese, Homöostase, Wundheilung, Immunantwort und metastatische Streuung von Tumorzellen (124,52,55,116). Sie stellen dabei eine Verbindung her zwischen extrazellulären Strukturen und Komponenten des Zytoskeletts (36,34,126).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Integrin  $\alpha_E\beta_7$ , das über die Bindung an E-Cadherin an der basolateralen Seite der Epithelzellen die Akkumulation der Lymphozyten im Epithel vermittelt. Ausgangspunkt war dabei die Beobachtung, daß sich  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zell-Subpopulationen, die man aus der BALF gewonnen hatte, in ihrem  $\alpha_E\beta_7$ -Expressionsverhalten deutlich voneinander unterschieden.

Während  $CD8^+$ -T-Zellen, unabhängig vom Vorliegen einer fibrosierenden Lungenerkrankung zu 70 bis 80%  $\alpha_E\beta_7^+$  waren, exprimierten nur 9,5% der  $CD4^+$ -T-Lymphozyten gesunder Probanden das  $\alpha_E\beta_7$ -Antigen an ihrer Oberfläche. Die Zahl  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen aus der BALF stieg bei Patienten mit IPF auf bis zu 52,9% an (Abbildung 6.1). Die Untersuchung der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf peripheren Blutlymphozyten der gleichen Patienten ergab im Gegensatz dazu, daß sowohl  $CD4^+$ - (<5%) als auch  $CD8^+$ -T-Zellen (<7%) kaum  $\alpha_E\beta_7$  exprimierten. Es zeigten sich auch keine nennenswerten Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten mit unterschiedlichsten Lungenerkrankungen. Selbst bei Patienten mit IPF und einem hohen Anteil  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten in deren BALF waren die Blutlymphozyten überwiegend  $\alpha_E\beta_7^-$ .

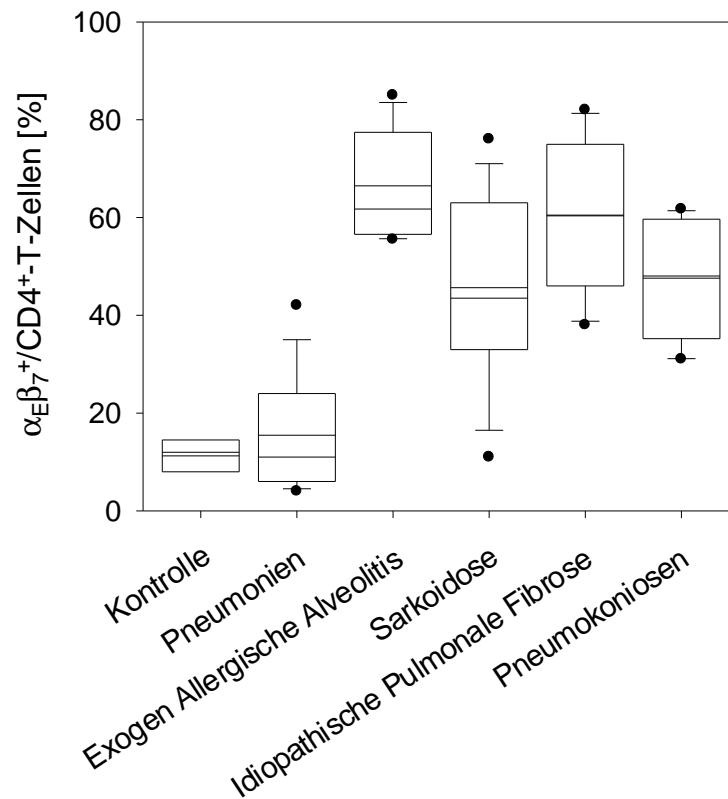




**Abbildung 6.1: Differentielle  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus der BALF bei verschiedenen Lungenerkrankungen**

Die Lavage-Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert und im Durchflußzytometer gemessen. \* Histologischer Nachweis einer "Usual Interstitial Pneumonitis" (UIP).

Mehrere Arbeiten (17,81,124) zeigten eine Korrelation zwischen fibrose-assoziierten Lungenerkrankungen und der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Abbildung 6.2).



**Abbildung 6.2:**  $\alpha_E \beta_7^+ / CD4^+$ -T-Lymphozyten aus der BALF bei verschiedenen Lungenerkrankungen mit und ohne Fibrose (17)

Die Expansion dieser  $\alpha_E \beta_7^+ / CD4^+$ -T-Lymphozyten im Rahmen fibrotischer Lungenerkrankungen legt nahe, daß die  $\alpha_E \beta_7$ -Expression im Zusammenhang mit der fibrotischen Entzündung steht. Welche funktionelle Bedeutung diese Zellen dabei haben, ist genauso ungeklärt wie die Frage, welche Faktoren für die Expansion dieser T-Zell-Subpopulation verantwortlich sind.

Ziel dieser Arbeit war es, in *In-vitro*-Versuchen stimulatorische Faktoren zu finden, die zur erhöhten Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten aus dem Blut führen. Darüber hinaus kann eine weitere Charakterisierung der  $\alpha_E \beta_7^+ / CD4^+$ -T-Lymphozyten, sowohl phänotypisch als auch funktionell, möglicherweise zu einem besseren Verständnis der Prozesse bei fibrose-assoziierten Lungenerkrankungen verhelfen und Ansätze für neue, effektivere Therapien aufzeigen.

## 6.2 In-vitro-Induktion von $\alpha_E\beta_7$ auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Wie oben dargelegt, expandieren  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten selektiv bei interstitiellen Lungenkrankheiten. Die hierfür verantwortlichen Faktoren sind jedoch nicht bekannt.

### 6.2.1 TGF- $\beta_1$ – profibrotisches Zytokin mit zentraler Bedeutung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Gegenwart von TGF- $\beta_1$  entscheidend für die Expression von  $\alpha_E\beta_7$  ist. Unabhängig von weiteren Versuchsbedingungen führte in den beschriebenen Experimenten erst die Zugabe von TGF- $\beta_1$  zu einer signifikanten Erhöhung des  $\alpha_E\beta_7$ -Antigens auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Dagegen blieb anti-CD3 allein ohne Einfluß. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten aus der Literatur (124).

TGF- $\beta_1$ , eine der drei Isoformen des Zytokins, wurde gerade in den letzten Jahren häufig mit der Fibrogenese in Zusammenhang gebracht. *In vitro* zeigte sich, daß TGF- $\beta_1$  eine mitogene und chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen besitzt. Die Akkumulation extrazellulärer Matrix (ECM) fördert TGF- $\beta_1$ , indem es einerseits deren Synthese steigert, andererseits die Produktion Matrix-abbauender Enzyme hemmt (19). Die Annahme, daß TGF- $\beta_1$  auch eine zentrale Rolle in Lungenfibrosen spielt, wird durch verschiedene Arbeiten unterstützt. So konnte eine erhöhte TGF- $\beta_1$ -Genexpression und Proteinsekretion in den Lungen von Tieren (49,65) und Menschen (66,78) mit Fibrose nachgewiesen werden.

Weitere Ergebnisse bestätigen die Wichtigkeit von TGF- $\beta_1$  in der Pathogenese der pulmonalen Fibrose (143). Ein Adenovektor-vermittelter Gentransfer im Rattenmodell induzierte eine vorübergehende Überexpression von biologisch aktivem und inaktivem TGF- $\beta_1$  im Lungengewebe. Dabei zeigte sich, daß die Überexpression von aktiviertem TGF- $\beta_1$  zu einer ausgedehnten und persistierenden Fibrose in der Lunge führte. Hingegen verursachte die Überexpression von latentem TGF- $\beta_1$  lediglich eine Infiltration mononukleärer Zellen. Die Überexpression von aktiviertem TGF- $\beta_1$  hatte histopathologisch dramatische Folgen. Die Ansammlung von Entzündungszellen (hauptsächlich mononukleär) und die Manifestation der Lungenfibrose, vor allem verursacht durch vermehrte Aktivierung der Fibroblastenproliferation und Stimulation zur Ablagerung verschiedener ECM-Proteine (Kollagen, Elastin, Fibronectin), waren um ein vielfaches beschleunigt. Neben TGF- $\beta_1$  werden andere Zytokine und Wachstumsfaktoren mit der fibrogenen Reaktion in Verbindung

gebracht. Hierzu gehören IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF (63,13,166). Jedoch auch diese drei letztgenannten Zytokine induzieren ihrerseits die Expression von TGF- $\beta_1$  (63).

Verbindet man die Beobachtung eines signifikant erhöhten Anteils  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4 $^+$ -T-Lymphozyten im Lungengewebe von Fibrosepatienten mit dem oben aufgezeigten Ergebnis, daß TGF- $\beta_1$  essentiell für die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression dieser Zellen ist, so wird ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieses distinkten Phänotypes und den fibrogenen Prozessen sehr wahrscheinlich. TGF- $\beta_1$  könnte hierfür die Verbindung sein.

Als Quelle der TGF- $\beta_1$ -Produktion gelten sowohl Entzündungszellen, wie Makrophagen, Mastzellen und Eosinophile, als auch nicht-inflammatorische Zellen, wie Epithelzellen und Fibroblasten (13,143,166). Allerdings stellt die Leukozyteninfiltration ein Charakteristikum der Lungenschädigung und -fibrose dar. Es ist anzunehmen, daß auch T-Zellen durch Produktion unterschiedlicher Zytokine, einschließlich TGF- $\beta_1$ , eine Fibrose induzieren können. Dafür spricht vor allem die Beobachtung, daß man bei Mäusen durch Inhibition des T-Zell-Einstroms mit anti-CD3-Antikörpern eine Bleomycin-induzierte Lungenfibrose abschwächen konnte (50).

Die Produktion von TGF- $\beta_1$  könnte also ein möglicher Weg sein, über den die CD4 $^+$ -T-Lymphozyten eine Fibrose induzieren. Daß die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression in direktem Zusammenhang mit diesem Prozeß steht, dafür spricht der Nachweis einer vielfach erhöhten TGF- $\beta_1$ -mRNA-Expression in  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD25 $^+$ /CD4 $^+$ -T-Lymphozyten im Vergleich zu in  $\alpha_E\beta_7^-$ -T-Zellen (14). Andererseits birgt die umgekehrte Annahme, daß die fibrogene Funktion dieser Subpopulation in hohem Maße von der Gegenwart von TGF- $\beta_1$  abhängig ist, die Möglichkeit neuer Therapieansätze. Ergebnisse aus Tiermodellen könnten hierfür wegweisend sein. So wurde bei Mäusen durch Bleomycin oder E. coli-Endotoxin ein Lungenödem und die Entwicklung einer Schocklunge (ARDS) ausgelöst. Mäuse, bei denen TGF- $\beta$  pharmakologisch ausgeschaltet wurde, entwickelten dieses Syndrom nicht (117). In einem Mausmodell für Sklerodermie geht der Manifestation der Erkrankung (Hautverdickung, Lungenfibrose und Hochregulierung der kutanen Kollagen-mRNA) eine Monozyteninfiltration mit verstärkter Expression der kutanen TGF- $\beta_1$ -mRNA voraus. Die Fibrose, sowohl in der Haut als auch in der Lunge, konnte bei diesen Mäusen durch Verabreichung von anti-TGF- $\beta_1$ -Antikörpern verhindert werden (86).

Vieles deutet auf eine mögliche funktionelle Bedeutung der  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4 $^+$ -T-Zell-Subpopulation hin. Allerdings sind die hierbei ablaufenden Prozesse noch nicht bekannt. Die

Regulation der TGF- $\beta_1$ -Expression ist ebenfalls größtenteils unklar. So finden sich Hinweise, daß neben der Entzündung auch andere, von Entzündungsmediatoren unabhängige Reaktionswege eine Rolle spielen könnten (73). Das Engagement des T-Zell-Rezeptors stellt möglicherweise solch einen Reaktionsweg dar.

### 6.2.2 Signalverstärkung durch Beteiligung des T-Zell-Rezeptors (TZR)

Um die Rolle des TZR besser darzustellen, wurde der Einfluß der Selektionsmethoden auf die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression untersucht.

Das Prinzip der immunomagnetischen Separation beruht darauf, daß durch magnetisch markierte Antikörper (Ak) Zellen mit definierten Oberflächenmerkmalen gezielt von einer Zellpopulation getrennt werden können. Die Bezeichnungen direkte (positive) und indirekte (negative) Reinigung beschreiben dabei, ob die Zielzellen selbst durch die Magnetbeads markiert und dadurch aus der Zellsuspension selektioniert werden oder, ob mit Hapten- und anti-Hapten-konjugierten Ak alle nicht gewünschten Subpopulationen eliminiert werden und die gewünschten Zellen im Eluat "übrigbleiben". Bei der positiven Isolierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgt also die Bindung von, mit Micro-Beads markierten, anti-CD4-Ak an das CD4-Molekül.

Die vorliegenden Daten zeigen, daß die Wahl der Selektionsmethode tatsächlich das Expressionsverhalten der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten beeinflusst. In Gegenwart von anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  nimmt der Anteil  $\alpha_E\beta_7^+$ -T-Zellen nach direkter Separation signifikant zu, verglichen mit indirekt gereinigten Zellen. Parallel dazu wird auch die Oberflächenexpression von CD25, CD95 und CD69 durch die direkte Reinigung deutlich erhöht.

Die Ursache für die nachgewiesenen Unterschiede in der Expression von  $\alpha_E\beta_7$  und den anderen Oberflächenmolekülen könnte darin liegen, daß das CD4-Engagement bereits während der Reinigung zu einem zellulären Signal führt. Denn das CD4-Molekül ist sehr eng mit dem T-Zell-Rezeptor (TZR) assoziiert und dient als dessen Co-Rezeptor. Es interagiert mit den nicht-polymorphen Regionen des MHC-Komplexes und beteiligt sich an der intrazellulären Signaltransduktion in T-Zellen (33,25,67). Der zytoplasmatische Teil von CD4 bindet p56lck, eine T-Zell-spezifische Proteintyrosinkinase (PTK), deren Aktivierung essentiell für den Signaltransfer bei der Kontrolle von Aktivierung und Proliferation in peripheren T-Zellen ist (151,28,154,156).

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden  $CD4^+$ -T-Lymphozyten indirekt isoliert und neben anti-CD3 und  $TGF-\beta_1$  mit anti-CD4 inkubiert. Durch diese Aktivierung über den CD4-Rezeptor wurde ein zumindest vergleichbarer Anteil  $\alpha_E\beta_7^+$ -T-Zellen induziert wie bei direkt gereinigten Zellen. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals die Bedeutung des CD4-Engagements für die Induktion von  $\alpha_E\beta_7$  klar dargestellt werden. Neben dem  $\alpha_E\beta_7$ -Antigen verdoppelte sich durch das zusätzliche Signal über den CD4-Rezeptor auch bei CD25, CD95 und CD69 die Expressionsrate. Nur im Hinblick auf die TNF-p75-Expression zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Selektionsmethoden. Jedoch verdoppelte eine zusätzliche Stimulation mit anti-CD4-Ak den Anteil TNF-p75<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Der Grund für diesen Widerspruch könnte darin liegen, daß sich der verwendete anti-CD4-Ak und der CD4-MicroBeads-Ak in ihrer Affinität zum CD4-Molekül unterscheiden und daraus, je nachdem, ein schwaches oder stärkeres Signal resultiert (48,102,157).

Bisher ist nur wenig über die direkte Wirkung der Selektionsmethoden auf das Expressionsmuster der gereinigten Zellen und die dadurch veränderte Zellantwort bekannt. Dabei handelt es sich bei der immunomagnetischen Zellseparation um eine sehr effiziente Methode, die in der Zwischenzeit weite Verbreitung gefunden hat. Einer der wenigen publizierten Vergleiche von direkter und indirekter magnetischer Zellseparation von  $CD4^+$ -T-Lymphozyten miteinander, erfolgte in der Weise, daß man jeweils die Produktion und Sekretion von IL-4 untersuchte (145). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß direkt selektionierte  $CD4^+$ -T-Zellen spontan IL-4 produzierten und sezernierten, wohingegen bei indirekt gereinigten Zellen kein IL-4 nachweisbar war. Die Bindung des Ak an CD4 führte also zu einem prompten Anstieg der IL-4-Produktion, einem Th2-Typ-Zytokin.

Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen, wie kritisch die Wahl der Selektionsmethode bei experimentellen Versuchsansätzen hinterfragt werden sollte. Der Einfluß einer Reinigungsmethode auf die Zellantwort darf nicht unterschätzt werden und muß immer bei der Interpretation der Ergebnisse mitberücksichtigt werden.

### 6.2.3 Die Bedeutung co-stimulatorischer Signale für CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Die Inkubation der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  induzierte, wie bereits oben beschrieben, bei maximal 30% der Zellen die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression, was den Ergebnissen *in vivo* bei CD4<sup>+</sup>-Blutlymphozyten von Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen entspricht (124). Über weitere co-stimulatorische Faktoren, die Einfluß auf die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression nehmen, ist bisher nur wenig bekannt.

Diverse andere Integrine wirken an der selektiven Migration verschiedener Leukozyten-Subpopulationen in Entzündungsgewebe mit (34,36,97,116,126). Die Zellen, die vom peripheren Blut ins Lungengewebe einwandern, interagieren dabei mit den spezifischen Liganden von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrinen auf Epithel- und anderen inflammatorischen Zellen oder mit der ECM (40,53,122,128,161). Im Gegensatz zu  $\beta_2$ -Integrinen erhöht die Kreuzvernetzung von  $\beta_1$ -Integrinen die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression *in vitro* (124). Diese Beobachtung konnte durch die eigenen Daten nicht bestätigt werden. Weder eine Kreuzvernetzung mit  $\beta_1$ - (experimentell durch anti-CD29 oder anti-VLA-4), noch mit  $\beta_2$ -Integrinen (experimentell durch anti-CD11b) beeinflusste die  $\alpha_E\beta_7$ -Induktion auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, verglichen mit einer alleinigen anti-CD3/TGF- $\beta_1$ -Stimulation. Daran änderte auch eine sequentielle Aktivierung, also die Präinkubation mit den jeweiligen Ak (anti-CD29, anti-VLA-4, anti-CD11b) zur Gewährleistung einer optimalen Kreuzvernetzung, nichts.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine enge Beziehung zwischen T-Zell-Aktivierung und  $\alpha_E\beta_7$ -Expression hin, wobei nicht nur der Signalweg über den TZR/CD3-Komplex, sondern auch die Beteiligung des CD4-Rezeptors von Bedeutung zu sein scheint. Zytokine und Co-Stimulatoren, die eine Rolle für die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen spielen, wurden auf ihren Einfluß auf die Induktion von  $\alpha_E\beta_7$  untersucht.

Für eine optimale T-Zell-Aktivierung sind zwei Signale notwendig. Das erste erfolgt durch die Ligation des TZR/CD3-Komplexes an das MHC-II-Molekül. Das zweite, co-stimulatorische Signal vermittelt das CD28-Molekül durch Bindung an B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86) auf der Zelloberfläche der antigen-präsentierenden Zelle (APC) (79,26,58,135). Dieses co-stimulatorische Signal ist essentiell für die Zelle und Voraussetzung für die Produktion von IL-2, eines der wichtigsten Zytokine für die Proliferation und Differenzierung

von T-Zellen. Die Blockade dieser Co-Stimulation führt über die ausbleibende IL-2-Produktion zu einer T-Zell-Anergie oder zur Apoptose der T-Zelle (105,98,134,136).

Von CD28 wurde berichtet, daß es zusammen mit einer Aktivierung über den CD4-Co-Rezeptor in der Lage ist, die IL-2-mRNA-Expression in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu erhöhen und darüber hinaus möglicherweise eine wichtige Rolle im T-Zell-Priming für die Th1- und Th2-Typ-Zytokinproduktion spielt (96). Außerdem konnte für die Co-Stimulation mit anti-CD28-Ak die Aufhebung eines inhibitorischen Effektes von anti-CD4-Ak auf die IL-2-Sekretion gezeigt werden (33,57,153). Diese Beziehung zwischen CD4 und CD28 warf die Frage auf, ob die Expression von  $\alpha_E\beta_7$  über diese Signaltransduktion mitkontrolliert wird. *In vitro* konnte jedoch dieser Zusammenhang nicht dargestellt werden. Die zusätzliche Inkubation von anti-CD28, neben anti-CD3 und TGF- $\beta_1$ , beeinflusste die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression nicht.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob IL-15 bei der Expression des  $\alpha_E\beta_7$ -Antigens eine Rolle spielt. IL-15 ist ein Zytokin, welches über den IL-2-R seine biologische Aktivität ausübt und in seiner Wirkung auf die T- und NK-Zell-Proliferation IL-2 ähnelt. Zu den Zellen, die IL-15 sezernieren können, gehören Epithelzellen, Monozyten, Fibroblasten, dendritische Zellen und auch aktivierte T-Zellen (46,4,64). Es konnte nachgewiesen werden, daß IL-15 für die Migration von T-Zellen in inflammatorische Gewebe von Bedeutung ist (106,6,162,163). Zudem scheint es nicht nur die Expression von CD69 auf T-Zellen und von VE-Cadherin auf Endothelzellen zu erhöhen (106), sondern auch die TNF- $\alpha$ -Expression von T-Zellen (89), ein Zytokin mit bekannter profibrotischen Wirkung (63). IL-15 ist ferner ein potenter Induktor von Chemokinen und deren Rezeptoren in peripheren Blut-T-Zellen und beteiligt sich auf diese Weise an der Ausbildung einer produktiven Entzündungsreaktion (114). Außerdem ist IL-15 in der Lage, in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die spontane Apoptose zu verhindern (101). Vor dem Hintergrund des vielschichtigen Spektrums an Effekten, die IL-15 vermittelt, schien es von Interesse zu sein, ob dieses Zytokin auch auf die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression von IEL einwirken kann, zumal IL-15 eine Rolle bei der Entwicklung einer T-Zell-Alveolitis bei M. Boeck zugeschrieben wird (4). Die eigenen Daten zeigen jedoch, daß die Gegenwart von IL-15 nicht nennenswert das Expressionsmuster auf den isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, im Vergleich zur Inkubation mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$ , verändert.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß kein weiterer Stimulus für eine Erhöhung der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression über die 30% gefunden werden konnte. Der Grund dafür liegt vielleicht darin, daß tatsächlich ausschließlich TGF- $\beta_1$  Einfluß auf die Induktion dieses Antigens



nimmt. Ergebnisse einer anderen Gruppe (124), die, im Gegensatz zu dieser Arbeit, mit anti-VLA-4 und anti-CD29 eine deutliche Mehrexpression von  $\alpha_E\beta_7$  auf  $CD4^+$ -T-Zellen erreichten, sprechen jedoch gegen diese Vermutung. Auch ist es denkbar, daß ein wesentlicher Faktor an entzündlichen und fibrotischen Prozessen *in vivo* noch nicht identifiziert wurde. Außer der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen von Rhis et al. finden sich in der Literatur hierzu keine weiteren Daten. Kritisch ist auch zu betrachten, inwieweit eine *In-vitro*-Aktivierung von T-Zellen überhaupt in der Lage ist, alle Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen und das tatsächlich *in vivo* vorliegende Mikromilieu zu imitieren.

#### 6.2.4 Die $\alpha_E\beta_7$ -mRNA-Expression von $CD4^+$ -T-Lymphozyten

Die mRNA-Expression von  $\alpha_E\beta_7$  wurde in  $CD4^+$ -T-Lymphozyten direkt nach der Reinigung, sowie 4 und 24 Stunden nach Inkubation mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$  gemessen. Wie bereits bei der Oberflächenexpression des  $\alpha_E\beta_7$ -Antigens, zeigten sich auch auf mRNA-Ebene deutliche Unterschiede zwischen direkter und indirekter Separation. Entgegen der Erwartung waren es jedoch die indirekt isolierten Zellen, die unmittelbar nach der Reinigung und nach 4 Stunden mehr  $\alpha_E\beta_7$ -mRNA exprimierten, als direkt selektionierte Lymphozyten. Diese Differenz zeigte sich selbst bei unstimulierten  $CD4^+$ -T-Lymphozyten. Nach 24-stündiger Inkubation verminderte sich die  $\alpha_E\beta_7$ -mRNA-Expression in indirekt gereinigten Zellen und lag damit fast in gleicher Höhe, wie die Expressionsrate der Zellen nach direkter Isolierung. Somit konnte nach 24 Stunden kein Unterschied mehr in der Genexpression nachgewiesen werden. Unabhängig von der Selektionsmethode und von einer Aktivierung war die  $\alpha_E\beta_7$ -mRNA in allen Zellen etwa gleich stark exprimiert.

Zur mRNA-Expression von  $\alpha_E\beta_7$  finden sich keine publizierten Daten. In dieser Arbeit wird erstmals die Genexpression dieses Antigens selbst untersucht und der erhebliche Einfluß der Reinigungsmethode dokumentiert. Die Tatsache, daß indirekt separierte Zellen in gleichem Maße (nach 24 h) oder sogar mehr  $\alpha_E\beta_7$ -mRNA (nach 4 h) exprimieren zeigt, daß offensichtlich eine Aktivierung der  $CD4^+$ -T-Zellen, sei es im Rahmen des Reinigungsvorganges mit  $CD4^+$ -MicroBeads oder durch Inkubation mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$ , für die Expression des Oberflächenantigens nicht zwingend erforderlich ist. Ein Ak-Engagement scheint in der Anfangsphase sogar eher eine hemmende Wirkung auf die Genexpression zu haben. Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Zeitpunkte wurden, entsprechend der

Erfahrung mit anderen Antigenexpressionen, willkürlich festgelegt und erfassen möglicherweise die maximale Expressionsdichte nicht.

Es ist daher in Zukunft für weiterführende Arbeiten zu diesem Thema notwendig, die Expression von  $\alpha_E\beta_7$ -mRNA zeitlich noch engmaschiger zu analysieren, da keinerlei Daten vorliegen, zu welchem Zeitpunkt die maximale Expressionsrate erreicht wird. Inzwischen deuten Ergebnisse einer anderen Arbeit unserer Abteilung darauf hin, daß dieser Peak nach 5 Tagen erreicht wird. Dies würde die eigenen Ergebnissen in der Oberflächenmessung bestätigen, die ein Maximum am 5. Tag nach Stimulation beschreiben.

### 6.3 Phänotypische Charakterisierung von $CD4^+$ -T-Zellen

Neben der Expression von  $\alpha_E\beta_7$  auf der Zelloberfläche von  $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden weitere Oberflächenmoleküle und deren Beeinflussung durch Stimulation und Selektionsmethode untersucht, um den Phänotyp dieser T-Zell-Population noch genauer zu charakterisieren.

Die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), ein Marker für eine frühe Zellaktivierung, wurde am 5. Tag nach Inkubation mit anti-CD3 und TGF- $\beta_1$  von mehr als 50% der Zellen exprimiert. Dabei zeigte der überwiegende Teil der  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen auch CD25 an der Oberfläche (Daten nicht gezeigt). Die CD25-Expression nahm sowohl zeitabhängig, als auch in Abhängigkeit von Selektionsmethode und der exogenen Aktivierung, den gleichen Verlauf wie bei  $\alpha_E\beta_7$ . In Gegenwart von anti-CD3/TGF- $\beta_1$  stieg die Expression von CD25 kontinuierlich an und hielt sich während des gesamten Meßzeitraumes auf hohem Niveau. Die Induktion von CD25 scheint über den CD4-Co-Rezeptor mitreguliert zu werden, da sich nach indirekter Reinigung ein signifikant niedrigerer Anteil  $CD25^+$ -Zellen nachweisen ließ, als nach direkter Isolierung. Die Exposition indirekt separierter Zellen mit anti-CD4-Ak induzierte eine gleich hohe Expressionsrate des CD25-Antigens, wie die direkte Isolation. Somit scheint es sich bei den  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen um eine Subpopulation im aktivierten Zustand zu handeln, wobei die Aktivierung nicht nur über den TCR/CD3-Komplex vermittelt wird, sondern auch über eine CD4-Co-Stimulation. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur  $\alpha_E\beta_7$ -Expression in BALF- $CD4^+$ -T-Zellen, die fast ausschließlich CD25-negativ sind (16).

Neuere Studien konzentrieren sich auf CD25 als Marker für regulatorische  $CD4^+$ -T-Zellen in Mäusen und Menschen (83). Diese regulatorischen T-Zellen (Treg), auch

Suppressor-Zellen genannt, sind wesentlich an der Regulation des Immunsystems beteiligt (103), wie der Immuntoleranz (130,11), der Regulation von Entzündungsreaktionen (120,111) und der T-Zell-Homöostase (14,7,8). Sie spielen ferner eine Rolle bei der Transplantattoleranz bzw. der Toleranz gegenüber viralen Antigenen, wie im Falle einer HIV-Infektion (160). Die supprimierende Wirkung der  $CD25^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten ist vor allem gegen andere T-Zellen gerichtet. So hemmen sie die Proliferation und Zytokinproduktion von  $CD8^+$ -T-Zellen (24). Die Mechanismen dieser Inhibition sind allerdings noch unklar. Die meisten *In-vitro*-Daten sprechen für eine, vom direkten Zell-Zell-Kontakt abhängige Supprimierung (104,31).  $CD25^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten hemmen beispielsweise die IL-2-Genexpression und IL-2-Produktion in  $CD8^+$ -T-Zellen und verhindern so deren Expansion. Außerdem kommt es in  $CD8^+$ -T-Zellen zu einer Inhibition der  $\alpha$ -Ketten-Expression der IL-2-R, so daß die Proliferation als Antwort einer exogenen IL-2-Aktivierung ausbleibt. Die allospezifische Zytotoxizität der  $CD8^+$ -T-Zellpopulation wird überdies durch Hemmung der Zytokinproduktion von Perforin, Granzyme B und IFN- $\gamma$  stark eingeschränkt. Bei all diesen Prozessen scheint ein Zell-Zell-Kontakt zwischen  $CD8^+$ -T-Zellen und den "Treg"-Zellen erforderlich zu sein (24), wohingegen Zytokine offenbar keinen wesentlichen Einfluß haben.

*In vivo* gibt es jedoch Hinweise darauf, daß dem inhibitorischen Effekt von regulatorischen  $CD25^+/CD4^+$ -T-Zellen deren Sekretion bestimmter Zytokine zugrunde liegt. Insbesondere IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  werden dabei immer wieder in den Mittelpunkt gestellt (160,14,76). Durch Experimente mit entsprechenden Zytokin-defizienten Mutanten oder durch Depletion des jeweiligen Zytokins ergab sich eine Abhängigkeit von IL-10 (118) oder TGF- $\beta$  und IL-4 (137,100). Auch ein Synergismus von IL-10 und TGF- $\beta$  bei intestinalen Entzündungen wurde beschrieben (119,12).

Andere Untersuchungen zeigen, daß  $\alpha_E\beta_7$  einen neuen Marker für eine distinkte Population regulatorischer T-Zellen darstellt (112,45,87,88,165). Diese Hypothese beruht auf der Beobachtung, daß  $\alpha_E\beta_7$ -tragende Zellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, ein hohes regulatorisches Potential besitzen, ebenso wie  $CD25^-$   $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen. So schützen  $\alpha_E\beta_7^+/CD25^-$  und  $\alpha_E\beta_7^+/CD25^+$ -T-Zellen im Modell mit SCID-Mäusen (Severe Combined Immunodeficiency) die Mäuse vor Ausbildung einer Colitis (74). Differierende Profile der Zytokinproduktion (IL-10) und Unterschiede in der Expression von CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen 4), welches ausschließlich an der Oberfläche von  $CD25^+/CD4^+$ -T-Zellen konstitutiv exprimiert wird, heben  $\alpha_E\beta_7^+/CD25^+/CD4^+$ -T-Zellen von

der  $\alpha_E\beta_7^-$ -Population ab (103).  $\alpha_E\beta_7^+/CD25^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten sind vorzugsweise im intestinalen lymphatischen Gewebe lokalisiert und kontrollieren dort Entzündungsprozesse und die T-Zell-Expansion (14).

Eine Funktion dieser distinkten Subpopulation in den Atemwegen ist nicht bekannt. Es kann jedoch angenommen werden, daß sie in der Lunge eine vergleichbare Funktion besitzen. Damit wäre die Expression von  $\alpha_E\beta_7$  nicht nur bei der Retention der Zellen im bronchialen Epithel von Bedeutung. Die Fähigkeit, andere T-Zell-Populationen in ihrer Proliferation zu hemmen, könnte ebenfalls die intraepitheliale Akkumulation  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten erklären. Da es Hinweise darauf gibt, daß TGF- $\beta$  ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von "Treg" ist (158,159), könnte es im TGF- $\beta$ -reichen Milieu zu einer Verschiebung zugunsten dieser Treg-Zellen kommen. Es wurde nachgewiesen, daß  $\alpha_E\beta_7^+/CD25^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten spontan sehr stark TGF- $\beta$ -mRNA, aber keine TGF- $\beta$ -R-mRNA exprimieren (14,84,131). Dies läßt den Schluß zu, daß diese Subpopulation in der Lage ist, TGF- $\beta$  zu produzieren und zu sezernieren, selbst aber nicht auf dieses Zytokin ansprechen kann. Vielleicht liegt darin der Schlüssel zum postulierten "unbekannten" kontinuierlichen Stimulus, der für die Unterhaltung fibrotischer Prozesse im Lungenparenchym verantwortlich ist. Die Diskrepanz zwischen diesem distinkten Phänotyp der "Treg" und dem Expressionsmuster von  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten aus der BALF bei IPF, die fast ausschließlich CD25-Antigen nicht exprimieren (16), ließe sich damit erklären, daß CD25-negative T-Zellen möglicherweise eine Vorstufe darstellen, aus denen in einem bestimmten Milieu die  $\alpha_E\beta_7^+/CD25^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten hervorgehen.

Ein weiteres Indiz für die These, daß der relative hohe Anteil  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen auf eine präferentielle Proliferation dieses Subtypes beruht, wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß die Zellen zumeist TNF-p75-positiv sind, hingegen TNF-p55 kaum nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Über TNF-p55 (TNF-R1) wird hauptsächlich eine Apoptose von T-Zellen vermittelt (61), während TNF-p75 (TNF-R2) eher eine Proliferation der Zelle induziert (155,150). Daraus läßt sich schließen, daß in  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen die TNF-p55-induzierte Apoptose ausgeschaltet und durch eine TNF-p75-vermittelte proliferative Antwort die Akkumulation dieser Population mitbedingt ist.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse zur Expression von CD95 und CD69 auf  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen differieren zu den Daten aus der Literatur. Während die eigenen Daten darlegen, daß alle  $\alpha_E\beta_7^+$ -T-Zellen auch CD95-positiv sind, kann auf diesen

Zellen kaum CD69 nachgewiesen werden. BAFL-CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zeigen jedoch einen zweifach positiven Phänotyp (CD69<sup>+</sup>/α<sub>E</sub>β<sub>7</sub><sup>+</sup>-T-Zellen), wobei auch α<sub>E</sub>β<sub>7</sub><sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen das CD69-Antigen an ihrer Oberfläche exprimieren (16). Dem steht gegenüber, daß *in vivo* α<sub>E</sub>β<sub>7</sub><sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, unabhängig von ihrer Herkunft (periphere LK, intestinale LK, Milz), eine wesentlich höhere Expressionsrate von CD69 aufweisen, als α<sub>E</sub>β<sub>7</sub><sup>-</sup>-T-Zellen (14,111).

Eine Übereinstimmung mit den Daten der vorliegenden Arbeit zeigt sich hingegen *in vivo* bei CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von HIV-infizierten Patienten, die zu 70% CD95 exprimieren, wovon allerdings über 94% der Zellen CD69-negativ sind (160). Der Status der Zellaktivierung scheint offensichtlich nicht unmittelbar mit der α<sub>E</sub>β<sub>7</sub>-Expression zusammenzuhängen, da der Phänotyp bzgl. der Oberflächenantigene CD69 und CD95 solche Varianzen aufweist. Es besteht auch die Möglichkeit, daß sich, je nach Kompartiment innerhalb eines Organs, Interaktionen mit anderen Strukturen (Epithel, Endothel, ECM) und vorherrschendem Milieu, distinkte Subtypen differenzieren, denen entsprechend unterschiedliche Funktionen zukommen.

## 6.4 Funktionelle Charakterisierung von unterschiedlich isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Subpopulationen

### 6.4.1 Die Genexpression von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Mit Hilfe einer MPCR war es möglich, die mRNA-Expression von 9 Genen für proinflammatorische Zytokine und deren Rezeptoren gleichzeitig zu untersuchen. Bei den analysierten Genen handelte es sich um die für TNF-α, TNF-R1, TNF-R2, IL-1β, IL-6, IL-6-R, GM-CSF, GM-CSF-R und GAPDH, wobei GAPDH als Haushaltsgen eingesetzt wurde. Es sollte gezeigt werden, welchen Einfluß die Selektionsmethode auf die Genexpression dieser Zytokine nimmt. Dabei wiesen die indirekt gereinigten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen deutlich weniger aktivierte Gene auf, als die direkt isolierten. Auch die Unterschiede in der Intensität der Banden zwischen Kotrollen und stimulierten Zellen fielen nach indirekter Separation geringer aus.

In den letzten Jahren verdichten sich die Hinweise darauf, daß inflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle bei fibrotischen Prozessen spielen. Insbesondere TNF-α, IL-1β

und IL-6 wird eine Rolle bei der Ausbildung einer Lungenfibrose zugeschrieben (72,70,85,109).

In der vorliegenden Arbeit exprimierten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten unabhängig von der Selektionsmethode die mRNA des IL-6-R. Dabei induzierte die exogene Aktivierung mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$  eine deutliche Mehrexpression von IL-6-R-mRNA sowie die mRNA-Expression von IL-6.

IL-6 wird von einer Vielzahl von Zellen sezerniert, einschließlich Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten sowie Endothelzellen, und vermittelt verschiedenste inflammatorische Vorgänge in der Lunge (147,85,146). Unter physiologischen Bedingungen scheint IL-6 keine profibrogene Wirkung auf das Gewebe zu entwickeln, sondern schützt vor einer Fibrose durch Verstärkung der Apoptose normaler Fibroblasten (95). Diese Funktion kehrt sich im Rahmen einer Lungenfibrose ins Gegenteil. In dieser Situation erhöht IL-6 die Viabilität bzw. die Überlebenszeit aktivierter Fibroblasten durch Hemmung apoptotischer Prozesse in der Zelle (94,139). IL-6 ist in der Lunge von IPF-Patienten signifikant erhöht, verglichen mit gesunden Probanden (149). Die Beobachtung, daß in den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen selbst ohne Aktivierung der IL-6-R exprimiert wird, zeigt die Fähigkeit dieser Zellen, im IL-6-reichen Milieu, z.B. im Rahmen einer IPF, auf dieses Zytokin zu reagieren.

IL-6 kann sowohl allein die Fibrogenese fördern, als auch im engen Zusammenspiel mit anderen Faktoren wie TNF- $\alpha$  (144,60). TNF- $\alpha$  selbst spielt ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese der Lungenfibrose (93), wobei die Oberflächenexpression seiner Rezeptoren, TNF-p75 und TNF-p55, für diesen Prozeß notwendig sind (80,107).

Die hier erhobenen Ergebnisse zeigen, daß die mRNA-Expression von TNF-p75 (TNF-R2) nicht von der Selektionsmethode abhängig ist. Nach Exposition mit anti-CD3 oder anti-CD3/TGF- $\beta_1$  nahm die TNF-p75-mRNA-Expression deutlich ab. Im Gegensatz dazu gelang der mRNA-Nachweis von TNF-p55 (TNF-R1) nur in direkt gereinigten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, wobei durch die Stimulationen die TNF-p55-mRNA runterreguliert wurde.

Das initiale Agens oder Ereignis, das die Entwicklung einer Lungenfibrose auslöst, ist nach wie vor unbekannt. Inzwischen wird auch eine genetische Disposition für IPF diskutiert. Offenbar sind Personen mit einem definierten Genotyp besonders gefährdet, an einer Lungenfibrose zu erkranken. Eine dieser Allelkombinationen ist IL-6 und TNF-p75, die in einer erhöhten Frequenz in einer IPF-Population nachweisbar war (110).

Der beschriebene Zusammenhang zwischen der Expression von IL-6 und TNF im Rahmen einer Lungenfibrose deutet auf eine mögliche Funktion der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

bei diesem Krankheitsbild hin. Die Aktivierung mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$  führt *in vitro* zur maximalen  $\alpha_E\beta_7$ -Expression in diesen Zellen. Betrachtet man die unterschiedliche Wirkung dieser Aktivierung auf die mRNA-Expression der beiden TNF-R, so lassen die Ergebnisse den Schluß zu, daß indirekt gereinigte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Proliferation gehemmt werden (TNF-p75<sup>+</sup>), während nach direkter Selektion bei den Zellen die TNF-induzierte Apoptose inhibiert wird (TNF-p55<sup>+</sup>) und gleichzeitig bei dieser Zellpopulation die Proliferationsfähigkeit bestehen bleibt (TNF-p75<sup>+</sup>). Dies würde wiederum die relative Vermehrung von  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei Lungenfibrose erklären.

Ein weiterer signifikanter Unterschied läßt sich in der Genexpression von IL-1 $\beta$  nachweisen (37,152). Direkt isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten exprimierten in Gegenwart von anti-CD3 oder anti-CD3/TGF- $\beta_1$  signifikant mehr IL-1 $\beta$ -mRNA, verglichen mit Zellen nach indirekter Reinigung.

IL-1 $\beta$ , das hauptsächlich von Makrophagen sezerniert wird, gehört ebenfalls zur Gruppe proinflammatorischer Zytokine und beteiligt sich an vielen akuten und chronischen Erkrankungen. IL-1 $\beta$  führt zu einer Aktivierung von T- und B-Zellen, sowie von Fibroblasten (148). Inzwischen ist unumstritten, daß es sich bei IL-1 $\beta$  auch um ein potentes profibrotisches Zytokin handelt (63,37,39,59,115). So wurde bei Ratten durch einen Gentransfer eine vorübergehende Überexpression von IL-1 $\beta$  in der Lunge induziert (71,141). Diese Überexpression von IL-1 $\beta$  ging in der ersten Woche mit einem lokalen Anstieg von IL-6 und TNF- $\alpha$  einher und zeigte im Gewebe Entzündungen und Zelluntergang. Eine Woche nach dem Expressionspeak von IL-1 $\beta$  nahm die Konzentration von TGF- $\beta_1$  in der BALF stark zu und blieb wochenlang bei diesem hohen Spiegel. Dies war mit einer schweren progressiven Lungenfibrose assoziiert, die durch die Präsenz von Myofibroblasten, Fibroblastenfoci und einer signifikanten extrazellulären Akkumulation von Kollagen und Fibronectin charakterisiert war.

Direkt separierte Zellen zeigten nach Stimulation mit anti-CD3/TGF- $\beta_1$  die höchste Expressionsrate für IL-1 $\beta$ -mRNA. Damit ist diese Zellpopulation in der Lage, durch Produktion und Sekretion von IL-1 $\beta$  eine Lungenfibrose zu initiieren, indem erst eine Entzündungsreaktion mit einhergehendem Gewebsuntergang verursacht wird, die anschließend in eine progressive, TGF- $\beta_1$ -induzierte Fibrose übergeht.

#### 6.4.2 Unterschiede der Genexpression $\alpha_E\beta_7^-$ und $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten

Die Unterschiede in der mRNA-Expression von  $CD4^+$ -T-Zellen ließen nur indirekt auf die  $\alpha_E\beta_7^-$  und  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -Subpopulationen schließen. Daher wurden diese beiden Subpopulationen voneinander getrennt und mittels MPCR analysiert. Beide Zellpopulationen zeigten eine starke Expression der mRNA von TNF-p55, TNF-p75 und IL-6-R, was mit den Daten direkt isolierter  $CD4^+$ -T-Zellen, wie oben beschrieben, übereinstimmt. Der deutlichste Unterschied zeigte sich wiederum hinsichtlich der Genexpression von IL-1 $\beta$ , wobei die  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen signifikant mehr exprimierten, als der  $\alpha_E\beta_7^-$ -Subtyp. Damit wird die Vermutung, daß  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten eine funktionelle Bedeutung bei der IPF haben, weiter erhärtet. So könnten diese Zellen nicht nur über regulatorische Mechanismen eingreifen, sondern wären über die Produktion von IL-1 $\beta$  direkt an der Entwicklung der Fibrose beteiligt.

Die Regulierung der IL-1 $\beta$ -Aktivität erfolgt offensichtlich allein durch lösliche IL-1-Rezeptor-Antagonisten, von denen es drei Isotypen gibt (IL-1RA, IL-1R1, IL-1R2), die unterschiedlich von verschiedenen Zelltypen produziert werden, darunter Epithelzellen, Neutrophile, B-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen (10,75). Bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose lassen sich in der BALF signifikant erhöhte Konzentrationen von löslichen IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA) und vom IL-1 $\beta$ -Protein selbst nachweisen. Das daraus errechnete Verhältnis von IL-1RA zu IL-1 $\beta$  wird als möglicher prognostischer Faktor hinsichtlich der Chronifizierung diskutiert (91).

Es ist denkbar, daß  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Lymphozyten über Suppression anderer Zelltypen die IL-1 $\beta$ -Regulierung hemmen, andererseits durch eigene Sekretion von IL-1 $\beta$  die Konzentration des Zytokins steigern und dadurch die Fibrose mitbedingen. Die Ergebnisse der mRNA-Expression von  $\alpha_E\beta_7^+/CD4^+$ -T-Zellen in der vorliegenden Arbeit stehen im Widerspruch zu den an BALF-Zellen erhobenen Daten von Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen (16). Diese Zellen exprimieren *in vivo* keine IL-1 $\beta$ -mRNA, während sie im Hinblick auf die Expression anderer Gene keine wesentlichen Unterschiede zwischen  $\alpha_E\beta_7^-$  und  $\alpha_E\beta_7^+$ -Subpopulationen aufweisen.



## 7 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezielt nach Faktoren gesucht, die *in vitro* die  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten beeinflussen. Es zeigte sich, daß zum einen TGF- $\beta_1$  essentiell für die Induktion des  $\alpha_E\beta_7$ -Antigens ist, zum anderen spielt die Co-Aktivierung des CD4-Rezeptors eine wesentliche Rolle. Darüber hinaus konnte kein weiterer Faktor gefunden werden, der die Expression von  $\alpha_E\beta_7$  signifikant erhöht.

Zum besseren Verständnis der *in vivo* ablaufenden Prozesse ist die Identifizierung der maßgeblich beteiligten Induktoren von  $\alpha_E\beta_7$  an der Oberfläche von  $CD4^+$ -T-Lymphozyten von großer Bedeutung und sollte daher in künftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

Ein Zusammenhang zwischen der fibrosierenden Entzündungsreaktion in der Lunge und der Präsenz  $\alpha_E\beta_7^+$ / $CD4^+$ -T-Lymphozyten im pulmonalen intraepithelialen Gewebe kann bisher noch nicht eindeutig bewiesen werden. Dennoch gibt es viele Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung dieser Subpopulation bei der Ausbildung einer Lungenfibrose.

In dieser Arbeit konnte diese Hypothese durch die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von  $\alpha_E\beta_7^+$ / $CD4^+$ -T-Lymphozyten weiter erhärtet werden. Die Analyse der Genexpression zeigte dabei, daß die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  signifikant erhöht ist in dieser distinkten Zellpopulation. Da IL-1 $\beta$  nicht nur als potentes proinflammatorisches Zytokin gilt, sondern zunehmend auch seine profibrotische Wirkung erkannt wird, könnten  $\alpha_E\beta_7^+$ / $CD4^+$ -T-Lymphozyten durch Produktion dieses Zytokins eine Lungenfibrose mitinduzieren. Der Phänotyp  $\alpha_E\beta_7^+$ / $CD25^+$ / $CD4^+$ -T-Lymphozyten scheint zudem regulatorische Funktionen in der Immunreaktion innezuhaben, die sich vor allem gegen andere T-Zellen richten und deren Proliferation hemmen.

Die ursprüngliche Annahme, daß das Integrin  $\alpha_E\beta_7$  hauptsächlich als Homingrezeptor für intraepitheliale Lymphozyten dient, muß entsprechend erweitert werden. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten deuten auf die zusätzliche Funktion von  $\alpha_E\beta_7$  als Marker einer spezifischen Subpopulation regulatorischer T-Zellen hin, die sich im Rahmen einer fibrosierenden Entzündung präferentiell intraepithelial ansammeln und sich auch aktiv an diesen profibrotischen Prozessen beteiligen.

Die Akkumulation der Subpopulation  $\alpha_E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten ließe sich einerseits durch die Bindung an E-Cadherin der Epithelzellen erklären, andererseits durch die Suppression und Proliferationshemmung anderer Zellpopulationen.

Die Fähigkeit dieser Zellen zur Produktion und Sekretion profibrotischer Zytokine ermöglicht die direkte Induktion fibrosierender Prozesse. Das TGF- $\beta_1$ -reiche Milieu, wie es bei Lungenfibrose vorherrscht, könnte zudem die Fibrose in Gang halten, indem es die Verschiebung zugunsten dieser regulatorischen T-Zellen weiter verstärkt. TGF- $\beta_1$  ist dabei möglicherweise der bisher noch nicht identifizierte "kontinuierliche Stimulus" für die Unterhaltung der Lungenfibrose.

Die Lungenfibrose entzieht sich bisher noch weitgehend einer effizienten Therapie. Die Kenntnis der hierbei ablaufenden Prozesse und der daran beteiligten Faktoren bergen die Chance, neue Behandlungswege zu entwickeln, beispielsweise durch Hemmung mit spezifischen Antikörpern. Ergebnisse aus Tiermodellen bieten dafür erste Ansätze.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Anonymous. Adhesion molecules in diagnosis and treatment of inflammatory diseases. *Lancet* 1990; 336:1351-1352.
2. Abitorabi MA, Mackay CR, Jerome EH, Osorio O, Butcher EC, Erle DJ. Differential expression of homing molecules on recirculating lymphocytes from sheep gut, peripheral, and lung lymph. *J Immunol* 1996; 156:3111-3117.
3. Abramson O, Qiu S, Erle DJ. Preferential production of interferon-gamma by CD4+ T cells expressing the homing receptor integrin alpha4/beta7. *Immunology* 2001; 103:155-163.
4. Agostini C, Trentin L, Facco M, Sancetta R, Cerutti A, Tassinari C, et al. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996; 157:910-918.
5. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994; 8:504-512.
6. Allavena P, Giardina G, Bianchi G, Mantovani A. IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. *J Leukoc Biol* 1997; 61:729-735.
7. Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol* 2002; 169:4850-4860.
8. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 2001; 166:3008-3018.

- 
9. Antoniades HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, et al. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1990; 86:1055-1064.
  10. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993; 54:167-227.
  11. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184:387-396.
  12. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; 190:995-1004.
  13. Atamas SP, White B. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:537-550.
  14. Banz A, Peixoto A, Pontoux C, Cordier C, Rocha B, Papiernik M. A unique subpopulation of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *Eur J Immunol* 2003; 33:2419-2428.
  15. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993; 74:185-185.
  16. Braun RK, Foerster M, Grahmann PR, Haefner D, Workalemahu G, Kroegel C. Phenotypic and molecular characterization of CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in bronchoalveolar lavage from patients with interstitial lung diseases. *Cytometry* 2003; 54B:19-27.
  17. Braun RK, Foerster M, Haefner D, Workalemahu G, Grahmann PR, Kroegel C. Evidence for a distinct intraepithelial,  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte population in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: Abstract.
  18. Braun RK, Kroegel C, Sterner-Kock A, Kock M, Giri SN, Ferrick DA. Role of  $\gamma\delta$  T cells in controlling lymphocytic infiltration and proliferation in mice after intratracheal instillation of bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: Abstract.

- 
19. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1991; 88:6642-6646.
  20. Burkhardt A. Pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Hum.Pathol.* 1986; 17:971-973.
  21. Burkhardt A. Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989; 140:513-524.
  22. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272:60-66.
  23. Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Moretto M, Dimier-Poisson IH, Lepage AC, Bout DT, et al. Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. *J Immunol* 1999; 162:5846-5852.
  24. Camara NO, Seville F, Lechler RI. Human CD4+CD25+ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8+ T cell activation. *Eur J Immunol* 2003; 33:3473-3483.
  25. Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:259-274.
  26. Cantrell DA. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* 2002; 105:369-374.
  27. Carre PC, Mortenson RL, King TEJ, Noble PW, Sable CL, Riches DW. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest* 1991; 88:1802-1810.
  28. Carrel S, Moretta A, Pantaleo G, Tambussi G, Isler P, Perussia B, et al. Stimulation and proliferation of CD4+ peripheral blood T lymphocytes induced by an anti-CD4 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1988; 18:333-339.
  29. Cerf-Bensussan N, Begue B, Gagnon J, Meo T. The human intraepithelial lymphocyte marker HML-1 is an integrin consisting of a beta 7 subunit associated with a distinctive alpha chain. *Eur.J.Immunol.* 1992; 22:273-277.

- 
- 
30. Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Lisowska-Grospierre B, Guy-Grand D, Griscelli C. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987; 17:1279-1285.
  31. Chai JG, Tsang JY, Lechler R, Simpson E, Dyson J, Scott D. CD4+CD25+ T cells as immunoregulatory T cells in vitro. *Eur J Immunol* 2002; 32:2365-2375.
  32. Chapman HA. Disorders of lung matrix remodeling. *J Clin Invest* 2004; 113:148-157.
  33. Chirmule N, Avots A, LakshmiTamma SM, Pahwa S, Serfling E. CD4-mediated signals induce T cell dysfunction in vivo. *J Immunol* 1999; 163:644-649.
  34. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268:233-239.
  35. Colby TV, Carrington CB. Infiltrative lung disease. In: Thurlbeck WM, editor. *Pathology of the Lung*. New York: Thieme, 1988:
  36. Collins TL, Kassner PD, Bierer BE, Burakoff SJ. Adhesion receptors in lymphocyte activation. *Curr.Opin.Immunol.* 1994; 6:385-393.
  37. Coulter KR, Wewers MD, Lowe MP, Knoell DL. Extracellular regulation of interleukin (IL)-1beta through lung epithelial cells and defective IL-1 type II receptor expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:964-975.
  38. Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am.J.Physiol.* 1990; 259:L159-L184
  39. Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8:253-265.
  40. Erle DJ, Brown T, Christian D, Aris R. Lung epithelial lining fluid T cell subsets defined by distinct patterns of beta 7 and beta 1 integrin expression. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1994; 10:237-244.
  41. Erle DJ, Pabst R. Intraepithelial lymphocytes in the lung: a neglected lymphocyte population. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2000; 22:398-400.

- 
- 
42. Fournier M, Lebargy F, Le-Roy-Ladurie F, Lenormand E, Pariente R. Intraepithelial T-lymphocyte subsets in the airways of normal subjects and of patients with chronic bronchitis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989; 140:737-742.
  43. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med* 1996; 334:1526-1529.
  44. Gauldie J. Pro: Inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1205-1206.
  45. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3:33-41.
  46. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994; 264:965-968.
  47. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001; 345:517-525.
  48. Horneff G, Guse AH, Schulze-Koops H, Kalden JR, Burmester GR, Emmrich F. Human CD4 modulation in vivo induced by antibody treatment. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 66:80-90.
  49. Hoyt DG, Lazo JS. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens, fibronectin and transforming growth factor-beta precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246:765-771.
  50. Huaux F, Liu T, McGarry B, Ullenbruch M, Xing Z, Phan SH. Eosinophils and T lymphocytes possess distinct roles in bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *J Immunol* 2003; 171:5470-5481.
  51. Humphries MJ, Mould AP, Tuckwell DS. Dynamic aspects of adhesion receptor function--integrins both twist and shout. *Bioessays* 1993; 15:391-397.
  52. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.

- 
- 
53. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110:673-687.
  54. Igietseme JU, Uriri IM, Hawkins R, Rank RG. Integrin-mediated epithelial-T cell interaction enhances nitric oxide production and increased intracellular inhibition of Chlamydia. *J Leukoc Biol* 1996; 59:656-662.
  55. Imhof BA, Dunon D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv.Immunol.* 1995; 58:345-416
  56. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988; 85:9436-9440.
  57. Jabado N, Pallier A, Le Deist F, Bernard F, Fischer A, Hivroz C. CD4 ligands inhibit the formation of multifunctional transduction complexes involved in T cell activation. *J Immunol* 1997; 158:94-103.
  58. Janeway CA, Travers P. T-cell mediated immunity. In: Janeway CA, Travers P, editors. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* Second Edition ed. New York: Current Biology Ltd., 1996:7:8-7:10
  59. Johnston CJ, Piedboeuf B, Rubin P, Williams JP, Baggs R, Finkelstein JN. Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation. *Radiat Res* 1996; 145:762-767.
  60. Jones KP, Reynolds SP, Capper SJ, Kalinka S, Edwards JH, Davies BH. Measurement of interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid by radioimmunoassay: differences between patients with interstitial lung disease and control subjects. *Clin Exp Immunol* 1991; 83:30-34.
  61. Kanaly ST, Nashleanas M, Hondowicz B, Scott P. TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens. *J Immunol* 1999; 163:3883-3889.



- 
- 
62. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1998; 157:1301-1315.
  63. Kelly M, Kolb M, Bonniaud P, Gauldie J. Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Curr Pharm Des* 2003; 9:39-49.
  64. Kennedy MK, Park LS. Characterization of interleukin-15 (IL-15) and the IL-15 receptor complex. *J Clin Immunol* 1996; 16:134-143.
  65. Khalil N, Berezney O, Sporn M, Greenberg AH. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J.Exp.Med.* 1989; 170:727-737.
  66. Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14:131-138.
  67. Killeen N, Littman DR. The regulation and function of the CD4 coreceptor during T lymphocyte development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 205:89-106.
  68. King DP, Hyde DM, Jackson KA, Novosad DM, Ellis TN, Putney L, et al. Cutting edge: protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 1999; 162:5033-5036.
  69. King T-EJ, Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron J-AJ, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 2001; 164:1025-1032.
  70. Knight DA, Ernst M, Anderson GP, Moodley YP, Mutsaers SE. The role of gp130/IL-6 cytokines in the development of pulmonary fibrosis: critical determinants of disease susceptibility and progression? *Pharmacol Ther* 2003; 99:327-338.
  71. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2001; 107:1529-1536.

- 
- 
72. Kotecha S, Wilson L, Wangoo A, Silverman M, Shaw RJ. Increase in interleukin (IL)-1 beta and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity. *Pediatr Res* 1996; 40:250-256.
  73. Kwong KY, Literat A, Zhu NL, Huang HH, Li C, Jones CA, et al. Expression of transforming growth factor beta (TGF-beta1) in human epithelial alveolar cells: a pro-inflammatory mediator independent pathway. *Life Sci* 2004; 74:2941-2957.
  74. Lehmann J, Huehn J, De La Rosa M, Maszyra F, Kretschmer U, Krenn V, et al. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:13031-13036.
  75. Levine SJ, Benfield T, Shelhamer JH. Corticosteroids induce intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I expression by a human airway epithelial cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15:245-251.
  76. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002; 196:1335-1346.
  77. Liebow AA. Definition and classification of interstitial pneumonias in human pathology. *Prog Respir Res* 1975; 8:1-31.
  78. Limper AH, Colby TV, Sanders MS, Asakura S, Roche PC, DeRemee RA. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in the nonnecrotizing granulomas of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:197-204.
  79. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991; 173:721-730.
  80. Liu JY, Brass DM, Hoyle GW, Brody AR. TNF-alpha receptor knockout mice are protected from the fibroproliferative effects of inhaled asbestos fibers. *Am J Pathol* 1998; 153:1839-1847.

- 
- 
81. Lohmeyer J, Friedrich J, Grimminger F, Maus U, Tenter R, Morr H, et al. Expression of mucosa-related integrin  $\alpha$ E $\beta$ 7 on alveolar T cells in interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:340-346.
  82. Ludviksson BR, Strober W, Nishikomori R, Hasan SK, Ehrhardt RO. Administration of mAb against  $\alpha$  E  $\beta$  7 prevents and ameliorates immunization-induced colitis in IL-2-/- mice. *J.Immunol.* 1999; 162:4975-4982.
  83. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2:816-822.
  84. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:753-791.
  85. Mattoli S, Colotta F, Fincato G, Mezzetti M, Mantovani A, Patalano F, et al. Time course of IL1 and IL6 synthesis and release in human bronchial epithelial cell cultures exposed to toluene diisocyanate. *J Cell Physiol* 1991; 149:260-268.
  86. McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol* 1999; 163:5693-5699.
  87. McHugh RS, Shevach EM. Cutting edge: depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. *J Immunol* 2002; 168:5979-5983.
  88. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16:311-323.
  89. McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1997; 3:189-195.
  90. McWilliam AS, Marsh AM, Holt PG. Inflammatory infiltration of the upper airway epithelium during Sendai virus infection: involvement of epithelial dendritic cells. *J.Virol.* 1997; 71:226-236.

- 
91. Mikuniya T, Nagai S, Takeuchi M, Mio T, Hoshino Y, Miki H, et al. Significance of the interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1 beta ratio as a prognostic factor in patients with pulmonary sarcoidosis. *Respiration* 2000; 67:389-396.
  92. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11:231-238.
  93. Miyazaki Y, Araki K, Vesin C, Garcia I, Kapanci Y, Whitsett JA, et al. Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1995; 96:250-259.
  94. Moodley YP, Misso NL, Scaffidi AK, Fogel-Petrovic M, McAnulty RJ, Laurent GJ, et al. Inverse effects of interleukin-6 on apoptosis of fibroblasts from pulmonary fibrosis and normal lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29:490-498.
  95. Moodley YP, Scaffidi AK, Misso NL, Keerthisingam C, McAnulty RJ, Laurent GJ, et al. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *Am J Pathol* 2003; 163:345-354.
  96. Morvan PY, Picot C, Dejour R, Genetet B, Genetet N. Distinct pattern of IL-2 and IFN-gamma gene expression in CD4 and CD8 T cells: cytofluorometric analysis at a single cell level using non-radioactive probes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1995; 41:945-957.
  97. Mostafavi-Pour Z, Askari JA, Parkinson SJ, Parker PJ, Ng TT, Humphries MJ. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol* 2003; 161:155-167.
  98. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness. *J Immunol* 1989; 142:2617-2628.

- 
99. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96:319-328.
  100. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194:629-644.
  101. Naora H, Gougeon ML. Interleukin-15 is a potent survival factor in the prevention of spontaneous but not CD95-induced apoptosis in CD4 and CD8 T lymphocytes of HIV-infected individuals. Correlation with its ability to increase BCL-2 expression. *Cell Death Differ* 1999; 6:1002-1011.
  102. Neuberger MS, Rajewsky K. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol* 1981; 11:1012-1016.
  103. Neumann-Haefelin C, Spangenberg HC, Thimme R, Blum HE. [Regulatory T cells: mechanisms and clinical perspectives]. *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129:1627-1630.
  104. Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, et al. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; 98:2736-2744.
  105. Olive D, Cerdan C. CD28 co-stimulation results in down-regulation of lymphotactin expression in human CD4(+) but not CD8(+) T cells via an IL-2-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1999; 29:2443-2453.
  106. Oppenheimer-Marks N, Brezinschek RI, Mohamadzadeh M, Vita R, Lipsky PE. Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model In vivo. *J Clin Invest* 1998; 101:1261-1272.
  107. Ortiz LA, Lasky J, Lungarella G, Cavarra E, Martorana P, Banks WA, et al. Upregulation of the p75 but not the p55 TNF-alpha receptor mRNA after silica and bleomycin exposure and protection from lung injury in double receptor knockout mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:825-833.

- 
- 
108. Ozaki T, Hayashi H, Tani K, Ogushi F, Yasuoka S, Ogura T. Neutrophil chemotactic factors in the respiratory tract of patients with chronic airway diseases or idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:85-91.
  109. Pan LH, Ohtani H, Yamauchi K, Nagura H. Co-expression of TNF alpha and IL-1 beta in human acute pulmonary fibrotic diseases: an immunohistochemical analysis. *Pathol Int* 1996; 46:91-99.
  110. Pantelidis P, Fanning GC, Wells AU, Welsh KI, Du BR. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha, tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1432-1436.
  111. Papiernik M. Natural CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. Their role in the control of superantigen responses. *Immunol Rev* 2001; 182:180-189.
  112. Papiernik M, Banz A. Natural regulatory CD4 T cells expressing CD25. *Microbes Infect* 2001; 3:937-945.
  113. Parker CM, Cepek KL, Russell GJ, Shaw SK, Posnett DN, Schwarting R, et al. A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992; 89:1924-1928.
  114. Perera LP, Goldman CK, Waldmann TA. IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes. *J Immunol* 1999; 162:2606-2612.
  115. Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 1992; 18:29-43.
  116. Picker LJ. Control of lymphocyte homing. *Curr.Opin.Immunol.* 1994; 6:394-406.
  117. Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang X, et al. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 2001; 107:1537-1544.
  118. Pontoux C, Banz A, Papiernik M. Natural CD4 CD25(+) regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol* 2002; 14:233-239.

- 
119. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996; 183:2669-2674.
  120. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993; 5:1461-1471.
  121. Rennard SI, Hunninghake GW, Bitterman PB, Crystal RG. Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1981; 78:7147-7151.
  122. Ricard I, Payet MD, Dupuis G. Clustering the adhesion molecules VLA-4 (CD49d/CD29) in Jurkat T cells or VCAM-1 (CD106) in endothelial (ECV 304) cells activates the phosphoinositide pathway and triggers Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Eur J Immunol* 1997; 27:1530-1538.
  123. Riede U-N, Costabel U. Respiratorisches System. In: Riede U-N, Schaefer H-E, editors. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1995:646-647.
  124. Rihs S, Walker C, Virchow-JC J, Boer C, Kroegel C, Giri SN, et al. Differential expression of alpha E beta 7 integrins on bronchoalveolar lavage T lymphocyte subsets: regulation by alpha 4 beta 1-integrin crosslinking and TGF-beta. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1996; 15:600-610.
  125. Rocha B, Guy-Grand D, Vassalli P. Extrathymic T cell differentiation. *Curr.Opin.Immunol.* 1995; 7:235-242.
  126. Rosales C, Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J.Leukoc.Biol.* 1995; 57:189-198.
  127. Rottman JB, Smith TL, Ganley KG, Kikuchi T, Krueger JG. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin alphaEbeta7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *Lab Invest* 2001; 81:335-347.

- 
128. Ruegg C, Postigo AA, Sikorski EE, Butcher EC, Pytela R, Erle DJ. Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J Cell Biol* 1992; 117:179-189.
  129. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.
  130. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-1164.
  131. Sankar S, Mahooti-Brooks N, Centrella M, McCarthy TL, Madri JA. Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2. *J Biol Chem* 1995; 270:13567-13572.
  132. Schieferdecker HL, Ullrich R, Weiss-Breckwoldt AN, Schwarting R, Stein H, Riecken EO, et al. The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J.Immunol.* 1990; 144:2541-2549.
  133. Schon MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, et al. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J.Immunol.* 1999; 162:6641-6649.
  134. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248:1349-1356.
  135. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992; 71:1065-1068.
  136. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:305-334.



- 
137. Seddon B, Mason D. Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes. *J Exp Med* 1999; 189:279-288.
  138. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134:136-151.
  139. Shahar I, Fireman E, Topilsky M, Grief J, Kivity S, Spirer Z, et al. Effect of IL-6 on alveolar fibroblast proliferation in interstitial lung diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 79:244-251.
  140. Shaw SK, Cepek KL, Murphy EA, Russell GJ, Brenner MB, Parker CM. Molecular cloning of the human mucosal lymphocyte integrin alpha E subunit. Unusual structure and restricted RNA distribution. *J Biol Chem* 1994; 269:6016-6025.
  141. Sheppard D. Pulmonary fibrosis: a cellular overreaction or a failure of communication? *J Clin Invest* 2001; 107:1501-1502.
  142. Sim GK. Intraepithelial lymphocytes and the immune system. *Adv Immunol* 1995; 58:297-343.
  143. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 1997; 100:768-776.
  144. Smith RE, Strieter RM, Phan SH, Lukacs N, Kunkel SL. TNF and IL-6 mediate MIP-1alpha expression in bleomycin-induced lung injury. *J Leukoc Biol* 1998; 64:528-536.
  145. Stanciu LA, Shute J, Holgate ST, Djukanovic R. Production of IL-8 and IL-4 by positively and negatively selected CD4+ and CD8+ human T cells following a four-step cell separation method including magnetic cell sorting (MACS). *J Immunol Methods* 1996; 189:107-115.
  146. Taga T. The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic and neurotrophic cytokines. *Ann Med* 1997; 29:63-72.

- 
147. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:797-819.
  148. Takeuchi M, Nagai S, Tsutumi T, Mio T, Izumi T. The number of interleukin 1 receptors on lung fibroblasts in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* 1999; 66:236-241.
  149. Takizawa H, Satoh M, Okazaki H, Matsuzaki G, Suzuki N, Ishii A, et al. Increased IL-6 and IL-8 in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from patients with sarcoidosis: correlation with the clinical parameters. *Clin Exp Immunol* 1997; 107:175-181.
  150. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MAJ, Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:9292-9296.
  151. Thome M, Duplay P, Guttinger M, Acuto O. Syk and ZAP-70 mediate recruitment of p56lck/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/zeta complex. *J Exp Med* 1995; 181:1997-2006.
  152. Tocci MJ, Hutchinson NI, Cameron PM, Kirk KE, Norman DJ, Chin J, et al. Expression in *Escherichia coli* of fully active recombinant human IL 1 beta: comparison with native human IL 1 beta. *J Immunol* 1987; 138:1109-1114.
  153. Tsygankov AY, Broker BM, Guse AH, Meinke U, Roth E, Rossmann C, et al. Preincubation with anti-CD4 influences activation of human T cells by subsequent co-cross-linking of CD4 with CD3. *J Leukoc Biol* 1993; 54:430-438.
  154. Ulivieri C, Pacini S, Bartalini S, Valensin S, Telford JL, Baldari CT. Obligatory cross-talk with the tyrosine kinases assembled with the TCR/CD3 complex in CD4 signal transduction. *Eur J Immunol* 1999; 29:2625-2635.
  155. Vancheri C, Sortino MA, Tomaselli V, Mastruzzo C, Condorelli F, Bellistri G, et al. Different expression of TNF-alpha receptors and prostaglandin E(2 )Production in normal and fibrotic lung fibroblasts: potential implications for the evolution of the inflammatory process. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22:628-634.

- 
156. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Samelson LE, Bolen JB. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature* 1989; 338:257-259.
  157. Waldor MK, Mitchell D, Kipps TJ, Herzenberg LA, Steinman L. Importance of immunoglobulin isotype in therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis with monoclonal anti-CD4 antibody. *J Immunol* 1987; 139:3660-3664.
  158. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:207-214.
  159. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol* 2001; 2:671-672.
  160. Weiss L, Donkova-Petrini V, Caccavelli L, Balbo M, Carbonneil C, Levy Y. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ Regulatory T cells Which Suppress HIV-specific CD4 T-cell Responses in HIV-infected Patients. *Blood* EDAT-2004/07/24 05:00 MHDA- 2004/07/24 05:00 AID - 10.1182/blood-2004-01-0365 [doi] AID - 2004-01-0365 [pii] PST - aheadofprint 2004;
  161. White ES, Thannickal VJ, Carskadon SL, Dickie EG, Livant DL, Markwart S, et al. Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  regulates migration across basement membranes by lung fibroblasts: a role for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:436-442.
  162. Wilkinson PC, Komai-Koma M, Newman I. Locomotion and chemotaxis of lymphocytes. *Autoimmunity* 1997; 26:55-72.
  163. Wilkinson PC, Liew FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J Exp Med* 1995; 181:1255-1259.
  164. Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* 1999; 190:1241-1256.

165. Zelenika D, Adams E, Humm S, Graca L, Thompson S, Cobbold SP, et al. Regulatory T cells overexpress a subset of Th2 gene transcripts. *J Immunol* 2002; 168:1069-1079.
166. Zhang K, Phan SH. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Biol Signals* 1996; 5:232-239.

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. C. Kroegel danke ich ausdrücklich für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Betreuung bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation. Die Diskussionen mit ihm waren für mich stets gewinnbringend und die anregende Kritik überaus förderlich für das Vorankommen der Arbeit.

Herrn Dr. R. Braun danke ich herzlich für die vielen praktischen Hinweise und motivierenden Diskussionen während der Durchführung der Experimente. Seine weitreichende Unterstützung und sein immerwährender Optimismus prägten die freundschaftliche und kollegiale Stimmung im Labor und trugen maßgeblich dazu bei, daß ich mich gern an die Zeit intensiven Arbeitens erinnere.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dipl. biol. M. Förster danken, der mir während der gesamten Zeit immer ein kompetenter und hilfsbereiter Ansprechpartner war. Durch sein persönliches Engagement wurde das Entstehen dieser Arbeit wesentlich gefördert.

Mein besonderer Dank gilt zudem Frau Yvonne Schlenker und Frau Annette Hartmann, die mich in die tägliche Routine des Labors einführten und mir in späteren Phasen mit Rat und Tat zur Seite standen. Ohne ihre Freundlichkeit und ihren Humor hätte die Arbeit in diesem Labor sicher nicht so viel Spaß gemacht.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Petra Gardina  
Geburtsdatum/ -ort 27.05.1973 in Bad Soden am Taunus

### Schulbildung

1979 – 1983 Hans-Furter-Grundschule Oberkirch  
1983 – 1992 Hans-Furter-Gymnasium Oberkirch; Abitur

### Studium

1993 – 2001 Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena  
1995 Ärztliche Vorprüfung  
1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Praktische Ausbildung

1992 – 1993 Freiwilliges Soziales Jahr; Vulpius-Klinik, Klinik für operative und konservative Orthopädie, Bad Rappenau  
03/1996 Famulatur; Kardiologie, St. Vincentius, Karlsruhe  
09/1996 Praxisfamulatur; Unfallchirurgie, Achern  
08/1997 Famulatur; Kolorektalchirurgie, Westmead Hospital, Sydney/AUS  
07/1998 Famulatur; Pädiatrie, Kinderklinik Offenburg  
4/00 – 03/01 Praktisches Jahr:  
- Innere Medizin: Kardiologie; St. Nepomuk, Erfurt  
- Chirurgie: Visceralchirurgie; Klinikum der FSU Jena  
- Anästhesie: mit Rotation; Klinikum der FSU Jena

### Promotion

10/1996 Einführungspraktikum im ehemaligen Labor von Prof. Kroegel; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Abt. Pneumologie, Freiburg im Breisgau  
seit 1997 Experimentelle Promotionsarbeit, Funktionsbereich Pneumologie; KIM I, Klinikum der FSU Jena  
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. Kroegel  
04/99 – 03/00 Beurlaubung vom Studium für die Promotion  
01/01 – 03/01 Promotionsstipendium im Rahmen der Nachwuchsförderung des IZKF (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung)  
04/01 – 03/02 Weiterführung der Versuche für die Promotion  
10/03 – 08/04 abschließende Arbeiten zur Promotion

### Ärztliche Tätigkeit

04/02 – 09/03 Ärztin im Praktikum; Allgemeine und viscerale Chirurgie, Klinikum der FSU Jena  
seit 09/2004 Assistenzärztin; Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Klinikum Heidenheim, Heidenheim an der Brenz

## Publikationen

### Abstracts

**Gardina P**, Braun RK, Foerster M, Workalemahu G, Haefner D, Kroegel C. Effect of CD4- or CD28-co-stimulation on integrin  $\alpha_E\beta_7$  and TNF-R2 expression on CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163: A599

**Gardina P**, Braun RK, Foerster M, Haefner D, Kroegel C. Regulation of the integrin  $\alpha_E\beta_7$  expression on CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes by anti-CD28 antibody- and IL-15-co-stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161: A931

**Gardina P**, Braun RK, Foerster M, Haefner D, Kroegel C. Regulation der  $\alpha_E\beta_7$ -Expression auf intraepithelialen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Einfluß der Kostimulation mit anti-CD4. *Pneumologie* 2000, 54: S85

**Gardina P**, Braun RK, Foerster M, Haefner D, Kroegel C. Differentielle Expression des IL-2 Rezeptors und des epithelialen Homing-Rezeptors  $\alpha_E\beta_7$ . Einfluß von IL-15 und CD28-Engagements. *Med Klinik* 2000, 95: S49

### Vorträge und Preise

**Gardina P**, Braun RK, Foerster M, Haefner D, Kroegel C. Differentielle Expression des IL-2 Rezeptors und des epithelialen Homing-Rezeptors  $\alpha_E\beta_7$ . Einfluß von IL-15 und CD28-Engagements. *Endausscheidung Young Masters, Forum "Junge Mediziner"* im Rahmen des 106. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden 2000

**Gardina P**. Expression des Integrins  $\alpha_E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Expansion von  $\alpha_E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten unter Einfluß co-stimulatorischer Signale. *Forschungszentrum Lobeda (FZL), "Tag der Nachwuchswissenschaftler"*, Jena 2004

## 11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. C. Kroegel, Dr. R. Braun, Dipl.-Biol. M. Förster
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 10. Januar 2005

Petra Gardina, Verfasserin